



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Estandarizacion y validacion a nivel
laboratorio de una prueba de PCR para la
deteccion directa de *Toxoplasma gondii* en
muestras biologicas

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
CLAUDIA PATRICIA RICO TORRES



FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D.F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

m 346556



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente	Prof. Fernando García Tamayo
Vocal	Prof. Claudia Huesca Gómez
Secretario	Prof. Elvia Coballase Urrutia
1er. Suplente	Prof. Enrique Ortega Soto
2do. Suplente	Prof. Bertha Espinoza Gutiérrez

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Claudia Patricia Rico Torres

Sitio donde se desarrollo el tema:

FECHA: 1/Agosto/2005


FIRMA: Claudia Rico

Instituto Nacional de Pediatría INP.

Subdirección de Medicina Experimental. Laboratorio de Bacteriología Experimental, Torre de Investigación.

Firma

Asesor del tema
Elvia Coballase Urrutia



Supervisor técnico
Ma. Dolores Correa Beltrán



Sustentante
Claudia Patricia Rico Torres

Claudia Rico

ESTA TESIS FUE PARCIALMENTE FINANCIADA POR CONACYT,
PROYECTO U-43079-M, INCLUYENDO UNA BECA PARA LA
LA ALUMNA.

DEDICATORIAS

A mi mamá Patricia

Para ti mamita, que eres mi más grande inspiración, orgullo y ejemplo te dedicó este gran logro en mi vida, ya que sin tu cariño, apoyo, comprensión y sacrificios no hubiera realizado este sueño. Y le doy gracias a dios que seas mi madre y mi mejor amiga y espero que sigamos caminado juntas como hasta ahora. Te adoro y recuerda que mis logros son tus logros y tus sueños son mis sueños.

A mi hermano Fernando

Gracias por tu cariño, paciencia y tu alegría por la vida que admiro tanto y por creermelo capaz de realizar este sueño.

A mi hermano Luis

Agradezco tu sinceridad y madurez de la que cada día aprendo más de ti. Gracias por tus consejos y por regalarme al sobrino más lindo del mundo y se que algún día me estarás dedicando tu tesis.

A mi hermanito Raúl (Rulis) y mi sobrino Donovan

A ti hermanito por ser mi alegría y mi razón de ser, no tengo palabras para agradecerte todo tu cariño.

Y a mi niño (Nonovan) aunque no tengas idea de este rollo, espero que algún día puedas leer estos renglones y sepas que te adoro y siempre te llevo en mi corazón.

Adriana (Adrianita)

En la preparatoria no sabía que tenía tan cerca a una personita extraordinaria. Le doy gracias a dios por haberme dado una segunda oportunidad para conocerte. Gracias por ser mi hermana mayor, gracias por ser mi ejemplo de vida y por tu cobijo cuando más lo he necesitado y un último gracias por todo tu cariño, paciencia y consejos durante estos años. Es una bendición ser tu amiga.

A mis padrinos Lulú y Chucho

Le doy gracias a dios por mandarme a los mejores padrinos del mundo, les agradezco de todo corazón su cariño y apoyo durante toda mi vida y aunque mi padrino ya no este, se que estará muy contento de que este realizando este logro en mi vida.

A mi tía Silvia

Gracias por su apoyo y por alegrar mi vida hasta en los peores momentos y sobretodo le agradezco por creer en mi y en este sueño.

A toda mi familia

De todo corazón le agradezco a toda mi familia por su apoyado, porque este sueño lo compartí y lo viví con todos ustedes.

A mis mejores amigas:

Luz Belinda (Chulalinda)

Tú me enseñaste que una amiga te quiere, te apoya, te aconseja, es tu cómplice, desea que realices tus sueños, es feliz si tu lo eres, te escucha y sobretodo es capaz de compartir su vida contigo. Gracias por tu gran amistad y cariño durante estos años, ya que sin tu apoyo no estaría escribiendo esta dedicatoria. Y como siempre hemos dicho "el destino" nos une y espero que sea por muchos años más.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de México por darme la oportunidad de realizarme académicamente y profesionalmente.

A la Facultad de Química por permitirme realizar mi sueño y gozar los mejores momentos de mi vida.

A mi mami Paty por su apoyo, paciencia y sacrificios para verme realizar mi sueño.

A mis hermanos Fernando, Luis y Raúl por su apoyo y cariño.

A **Elvia Coballase Urrutia** por darme la oportunidad de aprender, conocer, ayudar y confiar en las personas. Te agradezco de todo corazón tu ayuda, tu paciencia y comprensión para realizar esta tesis.

A la **Dra. Ma. Dolores Beltrán** por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartir su conocimiento y por brindarme su confianza. Mi más sincero agradecimiento por su apoyo y sobretodo por creer en mí.

A **Bernardino Gertrudis** por su apoyo, cariño y confianza que me haz brindado en este tiempo y gracias por ser mi amigo.

A mis compañeros de laboratorio José Luis Hernández, Héctor Luna, Irma Cañedo, Esther Calderón por brindarme su conocimiento y su ayuda para realizar esta tesis.

A mis amigas de laboratorio Dilia Solis, Aidé Fernández y Lorena por brindarme su amistad, apoyo y cariño durante al realización de esta tesis.

Al departamento de Genética de la Nutrición de la UNAM:

A la **Dra. Ma. Cristina Fernández Mejía** por abrirme las puertas de su laboratorio, por su disposición y apoyo para realizar mi tesis.

Al **Dr. Antonio Velásquez Arellano** por permitirme trabajar en su laboratorio, que fue indispensable para realizar este trabajo.

A **Alberto Rojas Ochoa** por brindarme su conocimiento y todo su apoyo para realizar este trabajo. Gracias por tu amistad.

A Sara Teresa Cruz, Nayeli Rodríguez Fuentes, Alonso Bilches Flores y mi gran amiga Ma. Ángeles López por ayudarme, por apoyarme y por lo más importante que me han brindado su amistad.

A mis grandes amigos de toda la vida:

A **Carmen Viveros Enríquez** por ser la amiga más antigua que tengo, y aunque tengamos caminos muy diferentes siempre estaremos juntas porque siempre te llevo en mi corazón a ti y a tu familia.

A mi gran amigo **Carlos Catana** por su alegría, sinceridad, confianza y por permitirme ser quién soy. Gracias por todas las vivencias juntos.

A mis amigos de preparatoria: Nydia, Javier, Liliana, Verónica y Rafael, les agradezco todas las vivencias y anécdotas que pasamos juntos, por su gran amistad y por ser un gran ejemplo de vida para mí.

A mis amigos de carrera: Belinda, Adriana, Carlos Catana, Jazmín, Norma, Anahí, Carlos Lugo, Alma, Roberto, Angel, Cinthya y Juan Carlos por su amistad, cariño y apoyo. Espero que sigamos juntos por muchos años más.

Y finalmente, a todas aquellas personas que colaboraron en esta tesis y en mi formación académica, profesional y personal.

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	6
BIOLOGÍA	7
<i>Morfología</i>	<i>7</i>
<i>Ciclo biológico</i>	<i>8</i>
VÍAS DE TRANSMISIÓN Y FACTORES DE RIESGO	10
a) <i>Vía oral</i>	<i>10</i>
b) <i>Vía transplacentaria</i>	<i>10</i>
c) <i>Vía donador- receptor</i>	<i>10</i>
d) <i>Otras vías de transmisión</i>	<i>10</i>
EPIDEMIOLOGÍA	11
PATOGENIA	13
RESPUESTA INMUNE	13
CLASIFICACIÓN DE LA TOXOPLASMOSIS	15
<i>Toxoplasmosis en inmunocompetentes:</i>	<i>15</i>
<i>Toxoplasmosis en inmunocomprometidos:</i>	<i>15</i>
<i>Toxoplasmosis congénita:</i>	<i>16</i>
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	17
<i>Detección de anticuerpos específicos</i>	<i>17</i>
<i>Demostración directa del parásito</i>	<i>19</i>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
OBJETIVO GENERAL	28
Objetivos específicos	28
HIPOTESIS	29
Hipótesis específicas.....	29
CLASIFICACION DE LA INVESTIGACIÓN	29
DISEÑO EXPERIMENTAL	30
ETAPA 1	30
ETAPA 2	31
ETAPA 3	32
ETAPA 4	32
METODOLOGÍA	33
OBTENCIÓN DE TAQUIZOITOS PUROS	33
CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR	33
PURIFICACIÓN DE DNA	34
<i>Purificación de DNA con una solución comercial</i>	<i>34</i>

<i>Purificación de DNA con solución de lisis preparada en el laboratorio.....</i>	34
CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE DNA.....	35
VERIFICACIÓN DE INTEGRIDAD DE DNA Y PRODUCTOS DE PCR.....	35
PCR SEMI-ANIDADA	35
<i>PCR semi-anidada en dos tubos</i>	37
<i>PCR semi-anidada en un tubo.....</i>	38
INFECCIÓN <i>IN VIVO</i>	38
INFECCIÓN <i>IN VITRO</i>	39
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	39
<i>Aislamiento in vivo</i>	39
<i>Aislamiento in vitro.....</i>	40
<i>ELISA</i>	40
MEDIDAS DE SEGURIDAD	42
RESULTADOS	43
PURIFICACIÓN DE DNA.....	43
ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR SEMI-ANIDADA EN UNO Y DOS TUBOS	44
RESULTADOS DEL AISLAMIENTO <i>IN VIVO</i>.....	49
RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG E IgM ..	52
RESULTADOS DEL AISLAMIENTO <i>IN VITRO</i>	55
RESULTADOS DE LA PCR SEMI-ANIDADA EN EL AISLAMIENTO <i>IN VIVO</i>	59
RESULTADOS DE LA PCR SEMI-ANIDADA DEL AISLAMIENTO <i>IN VITRO</i>	61
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69
APÉNDICE	88

RESUMEN

La toxoplasmosis es considerada una zoonosis parasitaria con un importante rango de distribución, infectando a una gran diversidad de animales incluyendo al ser humano. El agente causal, *Toxoplasma gondii*, es un protozoario intracelular obligado, bien adaptado a sus hospederos, pero que puede causar problemas de salud graves y en ocasiones fatales. La ingestión de ooquistes o de carne mal cocida induce la infección e invasión intestinal en los hospederos intermediarios como vacas, cerdos, aves y el hombre. Al transformarse en taquizoitos se distribuyen por todo el cuerpo, ocasionando daños como coriorretinitis, hepatitis, linfadenitis y encefalitis. En la transmisión congénita puede producir malformaciones en el feto y abortos. Se ha estimado que alrededor de un tercio de la población humana mundial presenta anticuerpos de clase IgG contra *T. gondii* en suero, que sugieren un contacto con antígenos de este parásito. La prevalencia de seropositivos es más alta en las regiones tropicales o en lugares donde se consume la carne cruda o se convive con gatos dentro del hogar. En América Latina los valores van de 9 al 98%. En México varios autores han reportado valores entre 16 y 56%. En la Encuesta Nacional Seroepidemiológica en 1987 se encontraron anticuerpos en el 50% de los individuos, con variaciones regionales desde 17% para Baja California Sur hasta 67.5% para Tabasco.

En las personas cuyo sistema inmunitario es competente, la toxoplasmosis aguda suele ser asintomática y autolimitada; estado que puede pasar inadvertido en el 80 al 90% de los adultos y en los niños con infección adquirida después de los 6 a 8 años. La naturaleza asintomática de esta infección hace que resulte difícil el diagnóstico en mujeres infectadas durante el embarazo, por lo que las formas congénitas son las más severas y con una mayor incidencia de secuelas irreversibles y producción de muerte en el producto.

El diagnóstico de *T. gondii* se hace por diferentes métodos: ELISA y sus variantes, como la prueba de avidéz, y el Western-blot. Estos métodos se utilizan para el tamiz prenatal en mujeres embarazadas. Una vez que la madre es detectada por serología, debe realizarse el diagnóstico confirmatorio de transmisión al embrión/feto.

Para ello, se han utilizado la infección de animales y los cultivos celulares, y en la actualidad también la demostración de DNA del parásito en muestras analizadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con la cual es posible realizar un diagnóstico en diferentes muestras biológicas en tiempos cortos.

La estandarización de la PCR semi-anidada fue de buena especificidad ya que el gen B1 fue un buen blanco para la detección del parásito en las muestras biológicas probadas, la sensibilidad fue de 100,000 parásitos aproximadamente, la cual se mejorará.

Se infectaron ratones BALB/c (4 por grupo) vía intraperitoneal y cultivos de células Vero (3 por grupo), con diferentes cantidades de taquizoitos (0, 1, 5, 25, 125, 625 y 3125). Se tomaron muestras durante 7 días y después cada 10 hasta terminar la infección, que duró 2 meses en los ratones y 1 mes en los cultivos celulares. Se tomaron muestras de líquido peritoneal, y sangre de la cola de los ratones, así como muestras de sobrenadante del cultivo de células. Con la cámara de Neubauer y azul tripano, se determinó el número de taquizoitos, de células vivas y muertas del huésped o cultivo. A partir del día 7 se observó una mortalidad del 100% de los ratones en los grupos infectados con 25 a 3,125 taquizoitos, no así en los grupos infectados con 1 y 5 taquizoitos, los cuales sobrevivieron hasta el término de la infección. El número de taquizoitos recolectados el día 7 fue mayor en los grupos de ratones o cultivos inoculados con dosis mayores de parásitos, en los ratones infectados con 1 y 5 parásitos los parásitos libres en el peritoneo disminuyeron a los 14 días, y desaparecieron posteriormente. En los cultivos aumentaron en picos cada 15 días, hasta el final de la infección con una disminución drástica de la viabilidad celular. La producción de anticuerpos fue mucho más rápida en los animales inoculados con dosis altas que aquellos con dosis bajas, apareciendo los de clase IgG 2 a 3 días después que los de tipo IgM. Con este trabajo se obtuvieron resultados sorprendentes, ya que la cepa RH demostró ser más virulenta de lo reportado en la literatura, lo que nos hace pensar que los modelos *in vivo* e *in vitro* que nos permitirán aislar y detectar en tiempos cortos al parásito, al igual que la serología en dosis muy bajas con cepas del genotipo I. Con estos procedimientos se apoyará el diagnóstico de la transmisión congénita y de la reactivación en personas inmunocomprometidas.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

El interés de estudiar a *Toxoplasma gondii* surgió a principios del siglo XX, por Nicolle y Manceaux, al aislar un parásito intracelular del hígado y bazo del roedor salvaje tunecino llamado *Ctenodactylus gondii*.^{1,3} Etimológicamente *Toxoplasma* viene de la palabra griega Toxon por la forma arqueada de su citoesqueleto.^{1,2,3}

Ocupa la siguiente posición taxonómica:^{2,4}

Phylum: *Apicomplexa*

Clase: Sporozoa

Subclase: Coccidia

Género: *Toxoplasma*

Especie: *T. gondii*

BIOLOGÍA

Morfología

Toxoplasma gondii presenta diferentes formas durante su ciclo de vida (figura 1):

El **ooquiste** es de forma ovoide y mide aproximadamente de 10 a 12 micras; está cubierto por un velo reticulado constituido por 3 capas, una electrodensa externa, una intermedia electrolúcida, y una interna poco electrodensa. Al madurar éste produce 8 esporozoitos infecciosos. El ooquiste junto con el quiste tisular son las formas parasitarias más importantes desde el punto de vista de transmisión.^{5,6,7,10} El **taquizoito** es la forma de replicación rápida (el tiempo de duplicación es de 4 a 6 horas), que se presenta durante la fase aguda de una infección. Presenta una peculiar forma de media luna que mide entre 4 y 5 micras; está compuesto de un extremo anterior que termina en punta y un posterior redondo; además, cuenta con un complejo apical que está constituido por el conoide, los anillos polares y los microtúbulos, estructuras involucradas en los procesos de motilidad, secreción e invasión celular.^{1,5,8,9} El **bradizoito** es la forma crónica y de lenta multiplicación, capaz de permanecer inactivo por largos periodos de tiempo. El **quiste tisular** o forma de resistencia del medio interior, esta formado por un acumulo de cientos e incluso miles de bradizoitos rodeados por una capa quística que puede medir entre 15 y 100 micras, que le permite permanecer en tejidos por largo tiempo.⁸⁻¹⁰

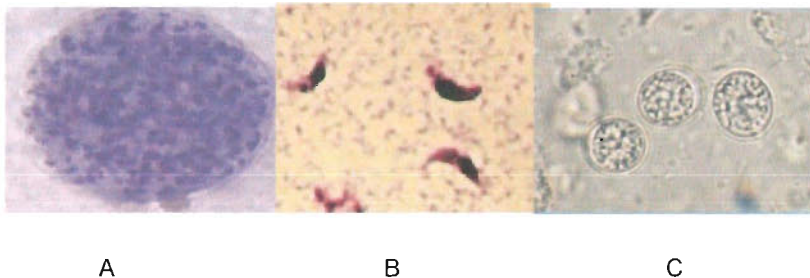


Figura 1. Estadios de desarrollo de *Toxoplasma gondii* A) Quiste tisular conteniendo bradizoitos B) Taquizoito C) Ooquiste. Las formas A y C son las fases infectivas por vía oral; el taquizoito es la forma infectiva en los casos de transmisión congénita.

Ciclo biológico

Fase de reproducción sexual:

La fase sexual del ciclo de vida de *T. gondii* (figura 2) se desarrolla en el huésped definitivo, los felinos, (incluido el gato doméstico) que puede infectarse con *Toxoplasma gondii* de dos maneras: a) puede ingerir presas infectadas (ratones o pájaros) en cuyos tejidos se encuentran alojados los quistes titulares, o b) puede ingerir ooquistes del medio ambiente (tierra o agua).¹¹⁻¹³ Al romperse el quiste tisular u ooquiste por las enzimas digestivas, se liberan los bradizoitos o esporozoitos e inician una proliferación en las células epiteliales del intestino delgado, iniciando así la fase sexual, por su transformación en gametos masculinos y femeninos, que al fusionarse dan origen al cigoto y posteriormente al ooquiste, el cual se elimina por medio de las heces del gato. Estos ooquistes son liberados al medio ambiente en forma no esporulada, y en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, son capaces de esporular, produciendo 2 esporoquistes con 4 esporozoitos cada uno, convirtiéndose en formas infecciosas. Un gato infectado puede liberar hasta 10 millones de ooquistes por día, durante un periodo de hasta 3 semanas y éstos pueden permanecer viables en la tierra o agua hasta 18 meses, contaminando el suelo, hortalizas, jardines y zonas de recreo donde conviven personas y animales domésticos .^{14,15}

Fase de reproducción asexual:

Los animales de sangre caliente, incluyendo al ser humano y las aves, son los huéspedes intermediarios, que pueden infectarse por ingestión directa de quistes tisulares presentes en carnes mal cocidas o de ooquistes en agua, frutas y verduras contaminadas.^{14,16} Por acción de los jugos gástricos, son liberados los bradizoitos o esporozoitos al ambiente intestinal, e invaden células epiteliales, dando lugar a los taquizoitos, que a su vez invaden a casi todas las células nucleadas, multiplicándose dentro de ellas hasta formar rosetas de 2 a 32 taquizoitos después ocurre la ruptura de las células, e invaden otras; pueden

hacerlo en los leucocitos y esto les permite circular en el torrente sanguíneo, saliva, leche y colonizar otros tejidos.

Finalmente, los taquizoitos comienzan a convertirse en bradizoitos, que se enquistan. Estos quistes pueden ser albergados en el sistema nervioso central, el miocardio, el músculo estriado y el útero, y permanecer en el organismo de por vida.¹⁷

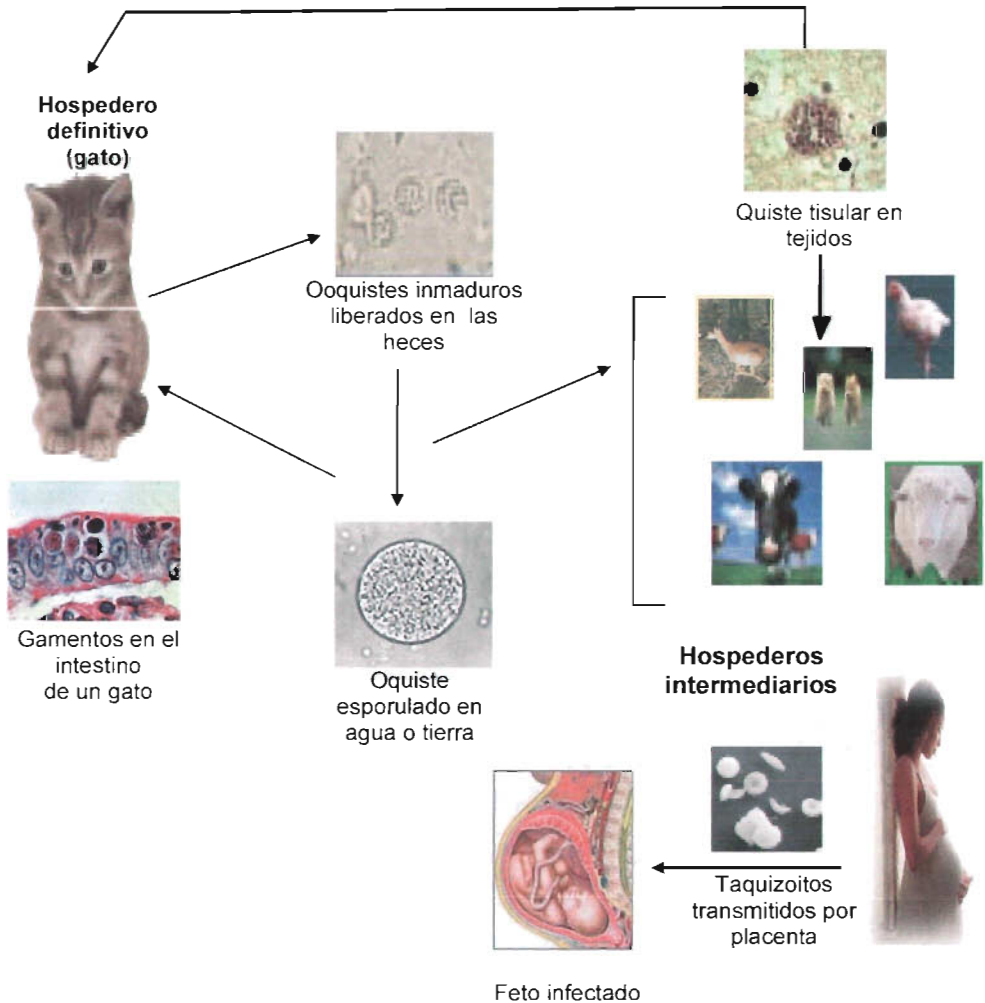


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

VÍAS DE TRANSMISIÓN Y FACTORES DE RIESGO

a) *Vía oral*

El contacto con excrementos de gato o la convivencia con gatos domésticos y la falta de higiene, son las principales vías de contaminación directa. El quiste presente en la carne mal cocida de cerdo, cordero, etc; o bien el agua, frutas y verduras contaminadas con ooquistes actúan como vehículo de transporte del parásito. Por otro parte, las personas que manipulan tierra o carne (jardineros, amas de casa, tablajeros, veterinarios, personal de rastros), y que presentan lesiones cutáneas y trabajan sin algún tipo de protección, también están expuestas indirectamente a una contaminación accidental. ^{2, 17,18}

b) *Vía transplacentaria*

La mujer que contrae toxoplasmosis en el curso de su embarazo, tiene riesgo de que el parásito pueda invadir la placenta y llegar a infectar al feto. Diversos factores como la carga parasitaria o la virulencia de la cepa van a condicionar la posibilidad de una infección fetal y su gravedad. ^{2,17-21}

c) *Vía donador- receptor*

Los pacientes que reciben un trasplante, pueden adquirir una infección primaria por quistes de *T. gondii*, presentes en el órgano (corazón, pulmón, riñón o hígado) de un donante infectado. Así también, potencialmente se podría contraer toxoplasmosis mediante una transfusión sanguínea, debido a la presencia de taquizoitos intracelulares en los leucocitos, causando una infección aguda. ²²⁻²⁷

d) *Otras vías de transmisión*

- Las moscas y las cucarachas pueden ser portadoras de ooquistes
- El consumo de alimentos contaminados como huevos crudos y leche no pasteurizada
- Beber agua de pozos contaminada con heces fecales de gato
- La inhalación de polvo puede transportar formas infectivas del parásito. ^{3,1}

EPIDEMIOLOGÍA

Se ha estimado que alrededor de un tercio de la población humana mundial presenta anticuerpos de clase IgG contra *T. gondii* en suero. El contacto con este parásito depende de factores climáticos, hábitos alimentarios, edad, educación y nivel socioeconómico.²⁸ La prevalencia de seropositivos es más alta en regiones tropicales, en lugares donde se consume carne cruda o se convive con gatos dentro del hogar.^{1,2,16} Este valor es bajo en niños menores de cinco años y alcanza su máximo entre los 20 y los 50 años.²⁷ En América Latina los valores van desde 9 hasta 98%, ya que desde edades tempranas, los niños juegan en el suelo, y están expuestos al medio ambiente.

En México varios autores han reportado valores entre 16 y 56%.¹ En la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 1987, se reportaron niveles de anticuerpos en 50% de los individuos, con variaciones regionales desde 17% para Baja California Sur hasta 67.5% para Tabasco.²⁹ Estudios más recientes indican una prevalencia de IgG de 20% en los donadores de sangre o mujeres con embarazo normal y de 0.2% de infección congénita detectada en una población de neonatos aparentemente sanos.³⁰⁻³²

En el cuadro 1, se observa la prevalencia en seres humanos y varias especies de animales.^{17, 33-67}

Cuadro 1. Prevalencia de *Toxoplasma gondii* en seres humanos y animales en el mundo.

	AMERICA %	ASIA %	AFRICA %	EUROPA %	OCEANÍA %
Inmunocompetentes	51.0-72.0	4.0-39.0	54.0-77.0	14.7- 58.0	1.08-3.5
Congenitos asintomático	0.08 -10.9		12.0	0.10-1.1	0.16
Inmunocomprometidos (Transplantados, VIH, Cancer)	30.0-80.0			50.0-66.1	
GATO	17.7-100.0	6.0 -15.0			42.0 -54.3
PERRO	32.2 – 33.0				23.0
RATAS	13.0-100				
PAVO	10.0		59.5		
POLLO	6.2-68.0		47.2		
PATOS			15.7		
PALOMA		4.9			
AVES	2.0-4.8	6.7			
OVEJA	49.1-65.0	25.0-80.0	33.2-39.4		
CABRA		19.6-20.0	26.8-39.1		
VACA	17.0	52.0	14.5		
CABALLO	6.7-9.0				1.0
CERDO	24.6-90.0	3.0-10.0	9.3-43.9	64.0	
MAMÍFEROS SALVAJES (CEBU, ANTILOPE, RINOCERONTE, BUFALO, ELEFANTE ETC)	13.3-100		5.5-50.0		
MAMÍFEROS MARINOS (NUTRIA, PINGÜINO)	2.2-3.2				

PATOGENIA

El proceso patogénico de *T. gondii*, se debe a la invasión celular, la multiplicación del parásito, la lisis celular y la necrosis.^{1,3} El taquizoito puede penetrar en las células nucleadas, adhiriéndose a la membrana celular e inducir cambios en su superficie, penetrando al interior a través de una unión membranosa móvil, y allí formar una vacuola parasitófora cuya peculiar naturaleza evita la acción de las enzimas contenidas en los lisosomas, lo que favorece su multiplicación activa sin peligro de ser destruido.^{16,68-70-72}

RESPUESTA INMUNE

En las personas cuyo sistema inmunitario es competente, la enfermedad suele ser asintomática y autolimitada, debido a que existe una respuesta innata mediada por los macrófagos, células dendríticas y células NK que a pesar de los mecanismos de evasión del parásito, inician la destrucción de los taquizoitos y las células infectadas, seguida de una respuesta adquirida, tanto humoral como celular.¹⁷

Una de las características inmunológicas de la infección por *T. gondii* es la fuerte y persistente respuesta inmune mediada por células, resultando en una protección por parte del hospedero contra el parásito. Durante la fase activa de la infección, los taquizoitos invaden células y se multiplican exponencialmente: cada taquizoito puede dar origen hasta a 32 parásitos; entonces, las células son destruidas y son liberados e invaden células vecinas. Durante este proceso, algunos parásitos pueden interactuar con células del sistema inmune.

Las células presentadoras de antígenos (CPAs) digieren enzimáticamente las proteínas de algunos taquizoitos y presentan sus epítopes a través de antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, de las siglas en inglés). Si los antígenos son presentados por medio del MHC clase I, son reconocidos por los linfocitos-T CD8+ y proliferan, entonces, son capaces de identificar células corporales que presentan antígenos específicos por el MHC-I, y se lleva a cabo el

proceso de citotoxicidad, para finalmente inducir apoptosis a las células infectadas. Al mismo tiempo, algunas CPAs presentan antígenos a través del MHC clase II interactuando con linfocitos-T CD4+; si en el microambiente se encuentran algunas citocinas como la interleucina 12 (IL-12), se desarrolla una respuesta de tipo Th1 contra *T. gondii*, liberando citocinas como interferón-gamma (IFN- α), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e IL-15, que activan a macrófagos y células NK, los cuales son importantes para controlar la replicación de los taquizoitos en ambas fases de infección, aguda y crónica, además de que son capaces de activar a más linfocitos-T CD8+ y CD4+. ⁷³⁻⁷⁵

Al inicio de la infección algunos linfocitos T-CD4+ liberan IL-2 que activa a los linfocitos-B con receptores específicos y éstos estimulados por las citocinas IL-4, IL-5 IL-6 se diferencian a células plasmáticas, para después dar origen a anticuerpos séricos dirigidos contra antígenos del parásito.⁴⁰ Asimismo, algunos antígenos de *T. gondii* interactúan directamente con receptores de linfocitos-B y éstos son capaces de producir inmediatamente anticuerpos de clase IgM e IgG.^{17, 76,77}

Las primeras inmunoglobulinas producidas son las de clase IgM, seguidas por las de clase IgA; ambas pueden ser detectadas durante la fase aguda de la enfermedad, es decir, durante los dos primeros meses después de la infección; sin embargo, la IgM puede circular hasta dos años después, por lo que su presencia no siempre se liga a una infección reciente. La inmunoglobulina G aparece más tardíamente, alcanzando el máximo en uno o dos meses, y luego persiste en valores estables durante años. ⁷⁸⁻⁸¹

CLASIFICACIÓN DE LA TOXOPLASMOSIS

Toxoplasmosis en inmunocompetentes:

Aunque en el 90% de los pacientes son asintomáticos, no se descarta el desarrollo de una enfermedad sintomática, y esto depende de la cepa infectante, la dosis, vía de transmisión y el estado inmunológico del hospedero. Los quistes permanecen latentes en tejidos, pero cuando se produce una inmunodeficiencia puede aparecer una reactivación de la infección debida a la rotura de los quistes y la proliferación del parásito en tejidos afines como el ojo y sistema nervioso.¹⁻³ Comúnmente presentan linfo-adenopatía, fiebre, mialgias, cefalea.^{18,20}

Toxoplasmosis en inmunocomprometidos:

En los pacientes con VIH/SIDA y otras enfermedades debilitantes como la leucemia, *Toxoplasma gondii* puede actuar como un parásito oportunista, ya que el individuo anteriormente infectado cuenta con numerosas formas quísticas diseminadas en su organismo que pueden reactivarse en una recaída inmune y dar lugar a una infección activa, dañando lugares poco protegidos por la inmunidad humoral y celular, como el cerebro y el ojo.^{2,82,83} De igual modo, en el caso de pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor por recibir algún trasplante, puede propiciarse la reactivación y proliferación de parásito causando graves daños.^{84,86} Estos pacientes pueden presentar encéfalo-mielitis, miocarditis, neumonías, corioretinitis, que ocasionan la muerte.

El sistema nervioso central es el más afectado, siendo los síntomas más comunes cefalea, fiebre, confusión y letargia, convulsiones, signos neurológicos focales y encefalitis toxoplásmica, que es la causa más común de muerte.^{26,87,88}

Toxoplasmosis congénita:

Es la primera infección del complejo de TORCH (toxoplasmosis, Rubéola, Citomegalovirus y Herpes simple) y una de las enfermedades congénitas con numerosos síntomas en el nacimiento y posterior a éste. La infección transplacentaria ocurre tras una infección adquirida antes o durante el embarazo.^{1,2} Una infección en el primer trimestre, tiene un riesgo de infección fetal bajo, de un 15%, ya que es más difícil el paso de los parásitos por la placenta, pero si pasan la enfermedad a desarrollarse es grave llegando a producir el aborto y muerte fetal.^{9,21,89} Una primo-infección materna en el segundo trimestre, tiene un riesgo de infección fetal moderado, del 30%; los fetos que se llegan a contaminar tienen riesgo de desarrollar síntomas severos, como hidrocefalia, calcificaciones cerebrales, hepatoesplenomegalia, ictericia, y epilepsia.^{89,90} En una infección materna del tercer trimestre, el riesgo de transmisión vertical es alto, de un 65%, la placenta es más permeable por lo que el parásito pasa más fácilmente. Algunas veces el bebé al nacer no presenta ninguna sintomatología por la infección, sin embargo, al llegar a la infancia e incluso en la adolescencia comienza a presentar la sintomatología. Generalmente, las secuelas más comunes son las neurológicas como deficiencias motoras y las oculares como la coriorretinitis.^{1,2, 91,92}

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la toxoplasmosis se basa en una gran diversidad de pruebas y técnicas, en las cuales emplean diferentes muestras biológicas. En general, estas pruebas se apoyan para tener un diagnóstico más eficaz y confiable.

Existen las pruebas serológicas y las pruebas de detección directa. Las primeras, se basan en la detección de anticuerpos específicos en el suero y las segundas, tienen por objeto demostrar la presencia del parásito en modelos *in vivo* e *in vitro*. Actualmente, con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es posible detectar el DNA del parásito en diferentes muestras biológicas para apoyar el diagnóstico.^{1,2,93}

Detección de anticuerpos específicos

A partir de los 40's, surgió una evolución de métodos de diagnóstico, desde el método de Sabin y Feldman hasta la introducción de la inmunofluorescencia indirecta (IF).^{1,2,94} En los últimos años han surgido nuevas herramientas de diagnóstico que permiten la identificación de las diferentes clases de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*, por ejemplo: IgA, IgE, IgM e IgG (y sus subclases), con el Ensayo Inmuno-Enzimático conocido como ELISA (del inglés Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). Es una técnica que utiliza anticuerpos acoplados a una enzima (conjugados), que se unen a anticuerpos presentes en el suero del paciente. En este sistema el antígeno o el anticuerpo se adsorbe a una fase sólida insoluble, y la enzima es capaz de producir una reacción de óxido-reducción, en la cual el sustrato se transforma en un producto colorido y se mide la intensidad del color desarrollado, la cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.⁶⁵ Existen diversos tipos de ELISA: directo, indirecto, de captura y competitivo. Todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos, a excepción del método indirecto que sólo detecta anticuerpos.

Las enzimas más empleadas son la peroxidasa de rábano (HRP) y su sustrato el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos que se oxidan y desarrollan color, como es la *o*-fenilendiamina (OPD), que continúa en forma soluble después de ser oxidada. Otras de las enzimas empleadas son la fosfatasa alcalina (FA) y la β -D-galactosidasa (BG).⁹⁵⁻⁹⁷

La técnica de Western-blot se emplea para identificar un patrón de reconocimiento antigénico por anticuerpos, debido a que es una prueba muy sensible y específica, que se ha empleado como prueba confirmatoria. La habilidad para discriminar entre infección primaria por *Toxoplasma gondii* adquirida en el embarazo o infección antes del embarazo, puede ser comprobado por un inmunoensayo para determinar la avidéz de los anticuerpos de clase IgG, específica contra *T. gondii*.⁶⁶ Esta técnica permite la detección de anticuerpos IgG de baja avidéz, propios del período agudo, por su antígeno específico, diferenciándolos de aquellos de alta avidéz, propios del período crónico.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Además de estas pruebas, el médico se auxilia de los estudios de gabinete para reforzar el diagnóstico clínico; dentro de éstos, se encuentran la radiografía, el ultrasonido, la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RM) para la búsqueda de calcificaciones cerebrales.^{3,18, 20, 96,97}

Demostración directa del parásito

Este método se emplea para poner de manifiesto al parásito (quiste o taquizoito) en diferentes muestras biológicas mediante tinciones con colorantes como el Wright y azul tripano entre otras. En material de biopsia de tejidos corporales los taquizoitos y los bradizoitos enquistados son observados con la tinción de Wright, hematoxilina-eosina, inmunofluorescencia específica y tinción con inmunoperoxidasa. La demostración de quistes con bradizoitos, confirma una infección previa, excepto si se encuentran quistes en placentas, fetos o recién nacidos, en los que indica una infección congénita.^{2,18,95}

Aislamiento in vivo

El ratón es el animal más utilizado para esta prueba, ya que puede ser fácilmente infectado por vía intraperitoneal u oral, con taquizoitos, bradizoitos o quistes de *T. gondii* provenientes de diferentes muestras biológicas (sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, etc). Dependiendo de la virulencia del aislado, el ratón puede desarrollar una infección aguda rica en parásitos en tiempos cortos o una infección crónica.¹⁰¹⁻¹⁰³ Un aislamiento positivo requiere la demostración de los anticuerpos anti-Toxoplasma en el suero del animal o la detección de los quistes en tejidos del ratón infectado.^{104,105} Esta técnica tiene la desventaja de que los resultados a menudo se demoran, dependiendo de la cepa de ratón que se trate, los parásitos pueden ser identificados hasta 30 días después de la inoculación. Este método es muy laborioso con el inconveniente del manejo de los toxoplasmas vivos que podrían contaminar al personal del laboratorio accidentalmente.^{104,106}

Aislamiento in vitro

Este procedimiento se lleva a cabo en diferentes líneas celulares (Vero, fibroblastos etc). La tinción de estos cultivos es muy útil, ya que permiten poner de manifiesto de forma específica a las formas del parásito.^{107,108} La sensibilidad de esta prueba es comparable a la inoculación en ratones, con la ventaja de que en 6 a 8 días (dependiendo el tipo celular) se pueden obtener resultados.¹⁰⁹ Algunos reportes han demostrado que los cultivos celulares pueden ser aplicados para un aislamiento rápido a partir de sangre, líquido amniótico y tejidos infectados, sirviendo como una prueba de apoyo para el diagnóstico serológico.^{1,2,110,111}

Demostración del DNA

La necesidad de tener un método rápido, específico y sensible que demuestre la presencia directa del parásito, para el diagnóstico y tratamiento temprano, ha sido motivo del desarrollo de técnicas moleculares, las cuales han permitido el estudio de la amplificación del genoma de *T. gondii*.¹¹²

Desde el descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick, se han implementado técnicas para purificar DNA de cualquier organismo, que han permitido el desarrollo de la Biología Molecular y la implementación de técnicas que a través de los años se han perfeccionado. En 1983, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que tiene como objetivo la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de DNA, basada en la replicación del DNA de los organismos por la DNA polimerasa.¹¹³

Para llevarse a cabo la reacción de PCR, se necesitan los siguientes componentes: ¹¹⁴

- ☑ Una DNA polimerasa estable a altas temperaturas para catalizar la síntesis de DNA de doble cadena
- ☑ Un par de oligonucleótidos sintéticos para la síntesis de DNA
- ☑ Deoxinucleósidos trifosfato: (dNTP's): dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- ☑ Cation divalente (Mg^{2+}): La DNA polimerasa requiere de un cation divalente para aumentar su actividad
- ☑ Solución amortiguadora (pH entre 8.3 y 8.8) y cation monovalente (KCl)
- ☑ DNA genómico puro

Existen tres pasos principales en la PCR, los cuales son repetidos en 30 a 40 ciclos, dependiendo de las características de la secuencia o gene que se vaya a amplificar (figura 3). ^{113,114}

- Ⓢ **Desnaturalización** del DNA doble cadena
- Ⓢ **Hibridación** de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras
- Ⓢ **Extensión** del cebador por actuación de la DNA polimerasa

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

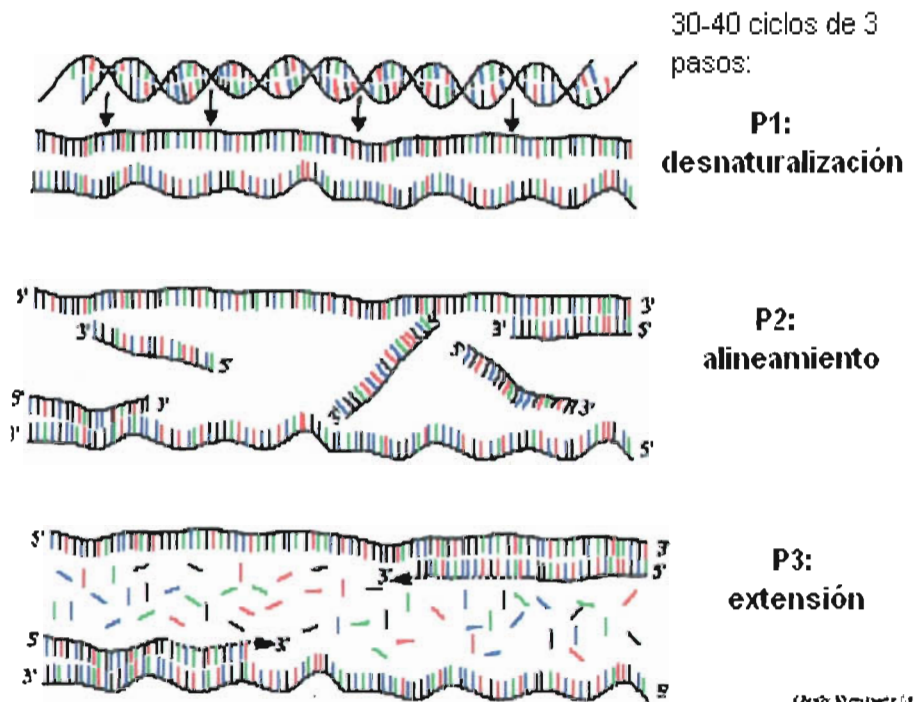


Figura 3. Pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este proceso se lleva a cabo en un termociclador; el equipo realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta (figura 4). La detección del producto de la PCR se realiza normalmente mediante electroforesis; dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que deseemos, se utilizan diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio (lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia (luz UV también), o radioactividad (placas de rayos X).¹¹⁴



Figura 4. Termociclador

Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de DNA se duplica en cada ciclo, obtenemos una cantidad de DNA de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica (figura 5).

CICLOS DE PCR

COPIAS

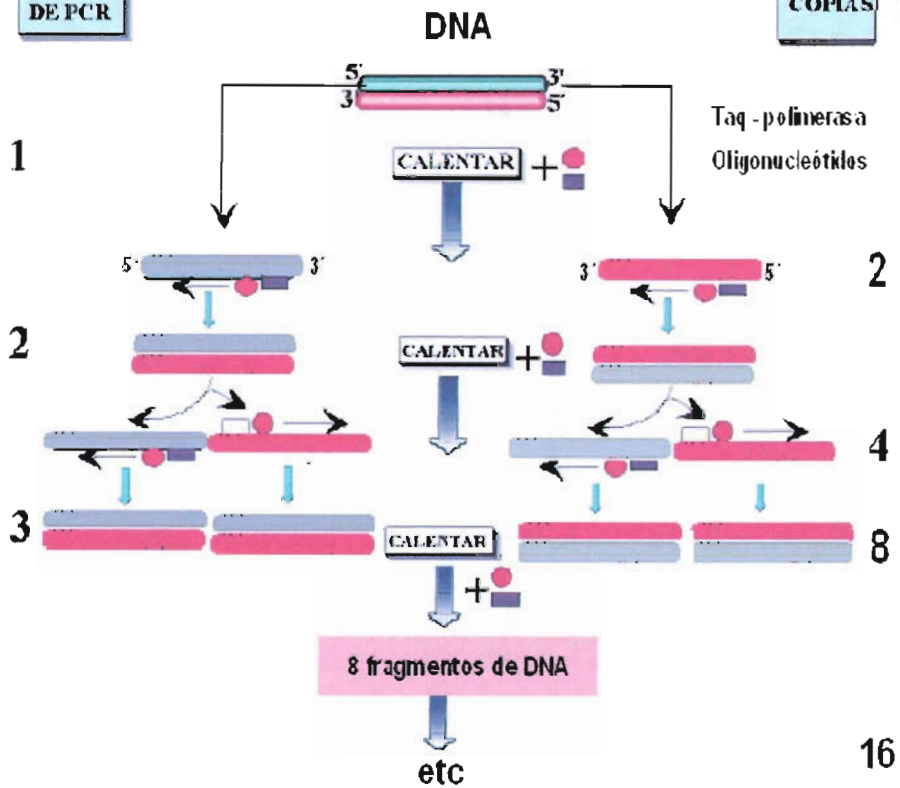


Figura 5. La amplificación exponencial de un gen en la PCR

La técnica de PCR, posee otras variantes que conservan el mismo principio. La PCR anidada, se basa en dos ciclos de amplificación con 4 iniciadores (externos e internos) y la PCR semi-anidada utiliza 3 iniciadores (2 externos y uno interno). Ambas nos proporcionan una alta sensibilidad y especificidad comparada con la PCR simple (figura 6).¹¹⁴⁻¹¹⁶ La PCR en Tiempo-Real se realiza mediante automatización, y los productos son detectados directamente durante la amplificación usando sondas marcadas con fluorescencia.^{117,118} Y finalmente, en la PCR Múltiple (Multiplex), se utilizan sondas marcadas para distintos blancos (genes), que emiten diferentes colores en ensayos múltiples que pueden ser detectados y diferenciados en una sola reacción.

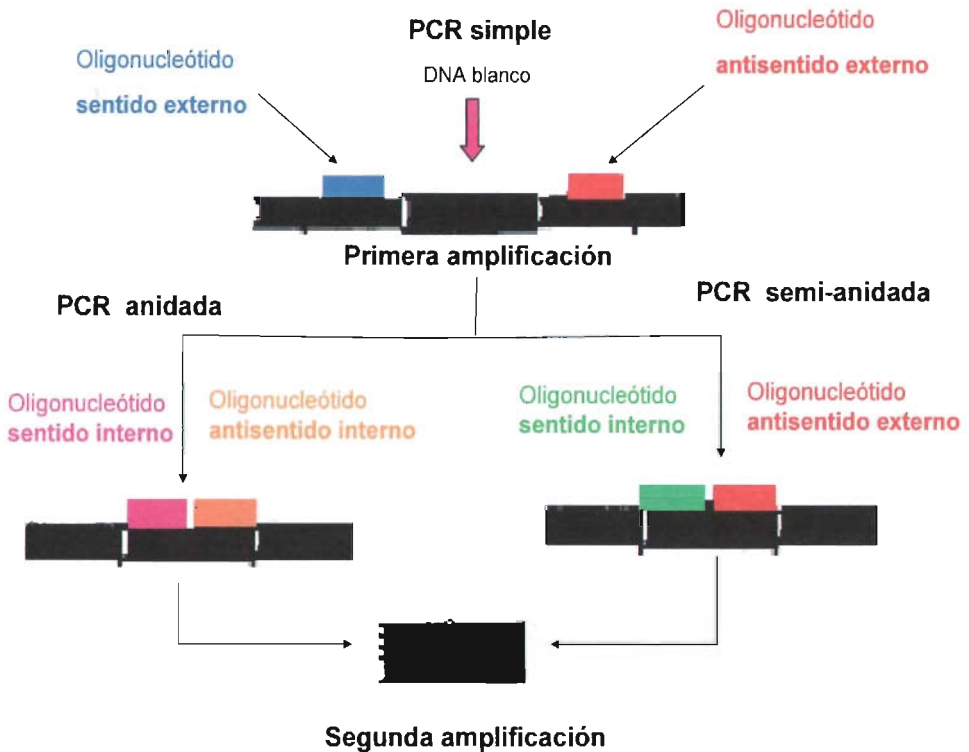


Figura 6. Diferencias de una PCR simple, anidada y semi-anidada.

La PCR para *T. gondii* fue propuesta por Burg y colaboradores en 1989, y empezó a ser aplicada a principios de los 90's para el diagnóstico de la infección aguda.¹²⁰

El gen B1, compuesto por 8×10^7 pares de bases, y del cual existen 35 copias dentro del genoma, codifica para una proteína de superficie.¹¹⁹⁻¹²¹

Este gen se ha utilizado como blanco para la amplificación y detección del DNA del parásito en diversas muestras biológicas, como fluido amniótico, sangre de cordón umbilical, sangre venosa, líquido cefalorraquídeo, orina, lavado broncoalveolar y diferentes tejidos.¹²⁰⁻¹²⁵ Por lo tanto, la PCR, es una buena prueba de apoyo a las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico, indicando la presencia del parásito durante una infección aguda o la transmisión vertical.^{93,126} El uso de la PCR en muestras de fluido amniótico ha revelado sensibilidades que superan el 80% y se ha reportado su gran utilidad en el diagnóstico de la encefalitis toxoplásmica en pacientes con VIH/SIDA, inmunosuprimidos, neonatos y animales.¹²⁷⁻¹⁴⁰ Además del gen B1 existen otros blancos específicos del parásito como el gen SAG-1 (p30) que codifica para un antígeno de superficie, del cual se han reportado buenos resultados, al igual que el gen B1.¹²⁰⁻¹²⁵ Otros blancos como la β tubulina o los genes ribosomales 18S y 5S del genoma nuclear han demostrado ser poco específicos y sensibles.^{115,141-146}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México no se ha estandarizado y validado alguna prueba de PCR para la identificación directa de *Toxoplasma gondii*. El diagnóstico de la infección para este parásito se basa principalmente de técnicas serológicas, las cuales pueden ser un problema cuando no se cuenta con una muestra sanguínea o cuando éstas son dudosas. En el caso de la transmisión congénita, las muestras serológicas de la madre no son suficientes para determinar la infección al feto, el líquido amniótico es la única muestra útil que permite dar pauta a un tratamiento oportuno a la madre y evitar daños severos al feto. Cuando sólo se cuenta con una muestra de tejido es difícil determinar la presencia de los quistes del parásito, como es el caso de un donador cadavérico o sangre total de pacientes con VIH/SIDA. Como se sabe, los quistes y ooquistes de *T. gondii* pueden encontrarse en carne, embutidos, frutas, verduras y agua, la identificación del parásito por una técnica rápida, sensible y específica sería de gran utilidad para prevenir su transmisión. Estos ejemplos, nos indican la gran necesidad de contar con la prueba de PCR para diversos usos tanto en el diagnóstico como en la prevención de la enfermedad. Con esta técnica es posible utilizar cualquier tipo de muestra biológica, no depende de la viabilidad del parásito, y es más rápida que la inoculación de ratones y el cultivo celular. La PCR además puede detectar cantidades de DNA equivalentes a 0.1-1.0 parásitos, siendo más sensible y específica en el 88% de los casos clínicos reportados que las técnicas tradicionales como el cultivo celular y la inoculación de ratones, que por lo regular son de baja sensibilidad (53% - 67%). Más aun, recientemente estas tres técnicas se han combinado para aumentar la sensibilidad y ofrecer un resultado más confiable. Se ha reportado, que la inoculación de ratón en combinación con el ensayo de PCR puede dar una sensibilidad de hasta 94.4%.

OBJETIVO GENERAL

- ▶ Estandarizar y validar a nivel laboratorio de investigación la PCR semi-anidada, el cultivo celular y la inoculación de ratones para la detección directa de *Toxoplasma gondii*.

Objetivos específicos

- ▶ Establecer las condiciones y tiempos óptimos para realizar la PCR semi-anidada.
- ▶ Establecer las condiciones y tiempos óptimos para la identificación del parásito en el modelo *in vivo* e *in vitro*.
- ▶ Comparar las 3 técnicas o combinaciones de ellas, en cuanto a su sensibilidad.

HIPOTESIS

- ▶ Al utilizar la técnica de PCR para la detección de *Toxoplasma gondii*, los resultados obtenidos son más rápidos, con mayor sensibilidad y especificidad al compararlos con la inoculación en ratones y el cultivo celular.

Hipótesis específicas

- ▶ La sobrevivencia de los ratones infectados dependerá de la cantidad de los taquizoitos inoculados.
- ▶ En el modelo *in vivo* los niveles de IgM e IgG se detectarán a partir del tercer y sexto día de infección.

CLASIFICACION DE LA INVESTIGACIÓN

- ▶ Básica, experimental, comparativa, prospectiva y longitudinal.

DISEÑO EXPERIMENTAL

ETAPA 1

Se estandarizó a nivel de laboratorio una PCR semi-anidada, utilizando taquizoitos del aislado RH de *Toxoplasma gondii*, obtenidos del peritoneo de ratones BALB/c.

Se purificó el DNA genómico de los taquizoitos por dos técnicas, se utilizó el reactivo comercial DNA-zol y una solución de lisis preparada en el laboratorio. Se determinó la integridad y pureza del DNA obtenido y se eligió la mejor técnica.

En la primera fase de la estandarización de la PCR semi-anidada se emplearon 2 oligonucleótidos que flanquean una secuencia específica del gen B1 de *T. gondii* (TM1 y TM2). Se probaron variaciones en la concentración de cloruro de magnesio, deoxinucleótidos (dNTP's), Taq polimerasa, y se encontraron las condiciones óptimas para obtener un producto de 619 pares de bases (pb).

Durante la segunda fase de la estandarización, se utilizó el producto de 619 pb, para probar diferentes concentraciones de cloruro magnesio, dNTP's y Taq polimerasa, junto con los oligonucleótidos (TM2 y TM3), los cuales flanquean un segmento más pequeño dentro del primer producto de la PCR de 619 pb y se obtuvo un nuevo producto de 362 pb.

En la tercera etapa, teniendo las condiciones óptimas de la PCR para la obtención de un producto de 619 y 362 pb, se probó la PCR semi-anidada en una sola reacción con los oligonucleótidos TM1, TM2, TM3 y dNTP's a diferentes concentraciones y se encontraron las condiciones óptimas para obtener el producto final de 362 pb.

ETAPA 2

Después de estandarizar la PCR, se formaron 6 grupos con 4 ratones cada uno, para la infección *in vivo* y 6 grupos de 3 cultivos de células Vero, para la infección *in vitro* como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Diseño de trabajo experimental

Grupo	Número de ratones	Cajas de cultivo	No. taq/ratón, caja o tubo	Días de muestreo							
				0	10	20	30	40	50	60	
				0	5	10	15	20	25	30	
A	6	3	1	*, M, G	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	*, M, G, A
B	4	3	5	*, M, G	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	*, M, G, A
C	4	3	25	*, M, G	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	*, M, G, A
D	4	3	125	*, M, G	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	*, M, G, A
E	4	3	625	*, M, G	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	*, M, G, A
F	4	3	3125	*, M, G	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	*, M, G, A
G	4	3	0	*, M, G	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	M, G, A	*, M, G, A	*, M, G, A

* PCR de taquizoitos puros

M Determinación de IgM

G Determinación de IgG

A Aislamiento *in vivo*, *in vitro*, cosecha, tinción y PCR

Se inoculó a cada grupo de ratones con la dosis correspondiente de taquizoitos suspendidos en amortiguador de PBS por vía intraperitoneal. Las mismas dosis de taquizoitos suspendidas en medio de cultivo estéril DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medicom, GIBCO), se inocularon en los cultivos confluentes de células Vero en medio DMEM y fueron monitoreadas durante un mes, debido al consumo de células viables durante la infección, observado en ensayos previos. Ambas infecciones se realizaron en campana de flujo laminar.

ETAPA 3

Durante los días de toma de muestra (cuadro 2), se extrajo sangre de la cola de cada ratón infectado y del control, para monitorear los títulos de anticuerpos IgM e IgG, con un ELISA indirecto. Al mismo tiempo, se colectó líquido peritoneal de cada ratón y se tomó el sobrenadante de cada pozo de los cultivos celulares infectados. De ambos tipos de muestra, se realizó una tinción con azul de tripano, para contar y determinar la viabilidad celular, por dos personas utilizando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico.

ETAPA 4

Se realizó la PCR semi- anidada en un tubo de todas las muestras colectadas, para obtener una banda de 362 pb.¹¹⁵

METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE TAQUIZOITOS PUROS

Los taquizoitos se obtuvieron por medio de la infección continua de ratones BALB/c, con un millón de parásitos del aislado RH de *T. gondii*, suspendidos en solución de NaCl 0.15M amortiguada con fosfatos 0.01M, pH 7.2 (PBS) e introducidos por vía intraperitoneal. Transcurridos 4 a 6 días, se tomaron de cada ratón infectado 3 mL de exudado peritoneal y posteriormente fueron sacrificados por dislocación cervical. Se tomó una alícuota de la muestra para calcular la viabilidad y la pureza de los taquizoitos obtenidos en un microscopio óptico. El resto de la muestra se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante; el botón formado se reconstituyó en solución conservadora (suero de ternera fetal 90%/dimetil sulfóxido 10%) en un tubo de 1.5 mL con tapa y se almacenó a -20°C. En el momento que se utilizó la muestra se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante y se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente; se realizó este lavado 3 veces. El botón resultante se utilizó para la purificación de DNA y la estandarización de la PCR.

CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

Para determinar la viabilidad y número total de células presentes en una muestra, se realizó una tinción con azul de tripano. Se contó en la cámara de Neubauer (MARIENFELD) y se consideraron las células viables y las células muertas, estas últimas se observan teñidas de azul. Se determinó el número total de células y la viabilidad de las mismas (ver apéndice).

PURIFICACIÓN DE DNA

Purificación de DNA con una solución comercial

Este procedimiento requiere de un reactivo comercial DNA-zol (GIBCO), que se compone de un detergente de guanidina, que permite la selectiva precipitación de DNA genómico. Para muestras con 3×10^7 células, se adicionó 1 mL del reactivo, se homogenizó 20 segundos en el agitador tipo vortex, se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió 1 mL de etanol (Sigma) al 100%, se mezcló por inversión, durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 5,000 rpm, durante 5 minutos. Se lavó el botón formado con 500 μ L de etanol al 95%, se secó al aire a temperatura ambiente y se resuspendió con 50 μ L de agua desionizada, se conservó a 4 °C, hasta su empleo.

Purificación de DNA con solución de lisis preparada en el laboratorio

Para muestras con 2×10^6 células, se adicionó 1 mL de solución de lisis (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0.5%, Proteinasa K 200 μ g/mL) y se dejó incubar toda la noche a 37°C. Se centrifugó la muestra a 3,500 rpm, durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionó isopropanol (Sigma) al 100% en una proporción 1:1. Este procedimiento se repitió una vez más y se mezcló por inversión 20 veces. Se centrifugó la muestra a 3,500 rpm durante 3 minutos. El DNA se visualizó como un pequeño botón y se eliminó el sobrenadante. Se colocaron los tubos invertidos en un papel absorbente. Se adicionaron 2 mL de etanol frío al 70%, se mezcló por inversión 20 veces, se centrifugó a 3,500 rpm durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron los tubos invertidos en papel absorbente. Se adicionaron 50 μ L de agua desionizada, se resuspendió el botón y se guardó de 2 a 8 °C.¹⁴⁷

CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE DNA

Se realizó una dilución 1:250 del DNA obtenido con agua desionizada. Para cuantificar y comparar la pureza, se leyeron las muestras a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 320 nm (ver apéndice).^{148,149}

VERIFICACIÓN DE INTEGRIDAD DE DNA Y PRODUCTOS DE PCR

Electroforesis en geles de agarosa al 1%

Para observar la integridad del DNA y los productos de PCR, se hizo una electroforesis en geles de agarosa al 1% revelados con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis horizontal. Se observó el gel en un transiluminador UV y se tomo una fotografía con la ayuda de una cámara Polaroid (ver apéndice).

PCR SEMI-ANIDADA

El blanco de elección para montar la técnica de PCR fue el **Gen B1**, por tener 35 copias en su genoma.¹²⁰⁻¹²⁵ Los oligonucleótidos utilizados (TM1, TM2 y TM3), se sintetizaron en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología de la UNAM, y fueron verificados por el programa NCBI/BLAST (figura 7). Se probó la especificidad de la PCR semi-anidada, con el DNA de taquizoitos de la cepa RH, el DNA de células Vero y el DNA de células D10 (hibridomas, células no relacionadas). La sensibilidad de la prueba se determino con la obtención del DNA de 1 a 3125 taquizoito, con adición de DNA de 1×10^5 células Vero para cada muestra.

Se trabajó una variante de la PCR simple, una PCR semi-anidada, en donde los oligonucleótidos TM1 y TM2 flanquean un segmento del gen B1 de 619 pb y el oligonucleótido adicional (TM3) junto con el TM2, permiten flanquear un segmento más pequeño de 362 pb, el cual permite aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba.¹¹⁵

TM1 5'-GAGAGGTCCGCCCCCAACAAG
(Sentido)

TM2 5'-CTGCTGGTGCACGGGAGTG
(Anti-sentido)

TM3 5'-CAGGAGTTGGATTTTGTAGA
(Sentido)

Figura 7. Secuencias del gen B1 utilizadas en la PCR semi-anidada

Para la estandarización de la reacción de la PCR semi-anidada, se corroboró la temperatura de alineamiento (T_m) de los oligonucleótidos TM1, TM2 y TM3, con la siguiente fórmula:

$$T_m = 4 (G+C) + 2(A+T)$$

Debido a que la PCR semi-anidada se estandarizó en dos fases, en la primera se obtuvo un producto de 619 pb con los oligonucleótidos TM1 y TM2 en una corrida de 30 ciclos, seguida de la toma de una alícuota de este producto (1 μ L), para amplificar un segmento más pequeño de 362 pb utilizando los oligonucleótidos TM2 y TM3 en otra corrida de 30 ciclos, se le denominó PCR semi-anidada en “**dos tubos**”.

En la última fase de la estandarización se probó la PCR semi-anidada utilizando a los 3 oligonucleótidos TM1, TM2 y TM3 en una corrida de 60 ciclos sin interrupción, a esta se le llamó la PCR en “**un tubo**”.

PCR semi-anidada en dos tubos

Para la estandarización de ésta prueba, se adicionaron 0.5 µg del DNA de taquizoitos puros, amortiguador de PCR 10X (50 mM KCl, 10 mM Tris.HCl, pH=8.3), MgCl₂ 2.5 mM (Invitrogen), de una mezcla de deoxinucleósidos trifosfato (dNTP's) dATP, dCTP, dTTP, dGTP (Roche) las concentraciones probadas fueron de 0.1 hasta 0.5 mM, DMSO (dimetil sulfóxido) al 0.06% (Sigma), las concentraciones de los oligonucleótidos TM1, TM2 se variaron de 0.007 hasta 2.6 µg/µL y las unidades de la Taq polimerasa (Invitrogen) probadas fueron de 2.5 hasta 10 U, en un volumen final de reacción de 50 µL, se utilizaron tubos de 0.2 mL, libres de DNAsas y RNAasas y previamente esterilizados. Las muestras fueron cubiertas con aceite mineral y amplificadas en un termociclador (MJ Research) en una corrida de 30 ciclos para amplificar un producto de 619 pb. Este producto se observó en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. Una vez confirmado el producto, se tomo una alícuota de 1 µL de el mismo y se inició una segunda amplificación, utilizando el mismo protocolo y sustituyendo los oligonucleótidos por TM3 y TM2, para amplificar un producto de 362 pb (ver cuadros 3 y 4). Se incluyó en cada reacción de PCR un control negativo (agua desionizada y DNA de células Vero) y un control positivo (taquizoitos puros del aislado RH). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% y marcador de peso molecular de 1300 a 70 pb (Invitrogen).¹¹⁵

PCR semi-anidada en un tubo

Conocidas las condiciones óptimas para realizar la PCR semi-anidada en dos tubos, se probó la PCR semi-anidada en un tubo. Se adicionaron 0.5 µg del DNA de taquizoitos puros, amortiguador de PCR 10X (50 mM KCl, 10 mM Tris.HCl, pH=8.3), MgCl₂ 2.5 mM, DMSO al 0.06%, se probaron diferentes concentraciones de los dNTP's que fueron desde 0.1 hasta 0.4 mM y de los oligonucleótidos TM1, TM2 y TM3 se variaron a partir de 0.06 hasta 0.5 µg/µL en un volumen final de reacción de 50 µL, utilizando tubos de 0.2 mL, libres de DNAsa y RNAasa, previamente esterilizados. Las muestras fueron cubiertas con aceite mineral y amplificadas en un termociclador (MJ Research) utilizando los mismos programas de amplificación de la PCR semi-anidada en dos tubos, en una corrida de 60 ciclos sin interrupción respectivamente. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis sobre un gel de agarosa al 1% y marcador de peso molecular de 1300 a 70 pb (Invitrogen).¹¹⁵

INFECCIÓN *IN VIVO*

Doscientos millones de taquizoitos frescos con una pureza del 95%, fueron resuspendidos en 10 mL de (PBS), se obtuvieron las cantidades de 1, 5, 25, 125, 625 y 3125 taquizoitos en un volumen final de 0.3 mL por el método de dilución limitante. Se infectó por vía intraperitoneal a ratones BALB/c de 6 semanas de edad (ver apéndice), con las dosis de infección seleccionadas.

INFECCIÓN *IN VITRO*

Aproximadamente 24,000 células Vero se sembraron en cajas de cultivo de 24 pozos, resuspendidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO), adicionado con suero fetal al 10% y antibiótico en un volumen de 2.0 mL, cuando los pozos estuvieron confluentes se realizó la infección por el método de la dilución limitante para obtener 1, 5, 25, 125, 625 y 3125 taquizoitos.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Aislamiento in vivo

En condiciones de esterilidad, se tomaron 3 mL de líquido intraperitoneal, se tomó una alícuota de la muestra para realizar una tinción con azul de tripano para el conteo y viabilidad de los taquizoitos extracelulares obtenidos, las lecturas se hicieron por duplicado por dos personas. El resto de la muestra se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 500 μ L de una mezcla crioprotectora, compuesta de suero fetal y DMSO (9:1) y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Para el procesamiento las muestras se lavaron con PBS (ver apéndice). Finalmente, con el botón resultante se obtuvo el DNA, el cual se cuantificó, se verificó su integridad y se realizó la PCR, el producto final de amplificación se observó en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio.¹¹⁵ Además del líquido peritoneal se tomó sangre de la cola de cada ratón en una dilución 1:10 en PBS para la determinación de anticuerpos IgG e IgM por la técnica de ELISA.

Aislamiento in vitro

De cada pozo de infección de células Vero, se tomó una alícuota de 10 μ L y se realizó una tinción con azul de tripano al 0.04% para conteo y viabilidad de los taquizoitos extracelulares y las células obtenidas, las lecturas se hicieron por duplicado por dos personas. El resto de la muestra se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos para la purificación de DNA, se cuantificó y se observó la integridad del DNA en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. Finalmente se realizó la PCR de las muestras.¹¹⁵

ELISA

Obtención del antígeno

El antígeno fue producido a partir de parásitos del aislado RH de *Toxoplasma gondii*, que se mantuvo congelada en nitrógeno líquido o viva por medio de pases en peritoneo de ratón BALB/c, de acuerdo al método descrito por Galván y col (1998).¹⁵⁰ Los parásitos obtenidos del exudado peritoneal de 20 ratones se resuspendieron en solución de PBS y se centrifugaron a 2,000 rpm, durante 10 minutos, 3 veces. Finalmente el precipitado se resuspendió en 1 mL de PBS, y se le adicionaron 10 μ l/mL de fenilmetil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 5mM; se colectaron en fracciones de 100 μ L que se almacenaron a -70° C hasta su uso. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford.¹⁵¹

Determinación de anticuerpos

Para determinar anticuerpos en el suero de los ratones inoculados, se realizó por medio de un ELISA indirecto, utilizando placas de 96 pozos marca Corning. Se colocaron 100 μL /pozo del antígeno de *T. gondii* a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.0, y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Se llevaron a cabo 3 lavados con 200 μL /pozo de PBS con tween 20 al 0.05% v/v (PBS-T) y 2 más con PBS, durante 5 minutos. Se incubó con leche descremada (svelty) al 5.0% en PBS-T durante 30 minutos a 37°C, se lavo otras 3 veces con PBS-T y 2 más con PBS, se realizó una dilución (1:150) para IgG y una dilución (1:50) para IgM en PBS-T de los sueros de ratones. Se incubaron, por duplicado, durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar 3 veces con PBS-T y 2 con PBS, se añadieron 100 μL /pozo del conjugado correspondiente (se usaron conjugados comerciales de peroxidasa-anticuerpos contra IgM, e IgG por separado) a una dilución de (1:1000) para IgG y una dilución de (1:250) para IgM. Se incubaron 2 horas más a 37 °C y se hicieron 3 lavados con PBS-T y 2 con PBS. Para revelar la reacción se añadieron 100 μL /pozo de la solución de sustrato/cromógeno que contiene, por cada 10 mL de solución de citratos 0.1M, 4 μL de peróxido de hidrógeno al 30%, y 4 mg de O-fenilendiamina. Se incubó durante un máximo de 30 minutos, después se paro la reacción con 50 μL /pozo de H_2SO_4 2.0 N y se registro la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (WallacVictor²1420Multilabelcounter).

MEDIDAS DE SEGURIDAD

Para el cambio de cama e inoculación se utilizó el equipo de bioseguridad adecuado, como son guantes de látex desechables, cubrebocas, y bata quirúrgica desechable, los desechos de viruta de las camas, las torundas con alcohol, gasas, jeringas y tubos que se utilizaron, se desecharon en bolsas rojas biológico infecciosos, las lancetas y agujas de las jeringas, en los recipientes para punzocortantes.

Se tomó en cuenta el decreto ley de protección a los animales del Distrito Federal, publicadas en la Gaceta Oficial del Distrito Federal publicada en el año 2002 y las Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana 1999).¹⁴⁶

RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de éste trabajo fue la estandarización de una PCR semi-anidada y comparar su sensibilidad con los aislamientos *in vivo* e *in vitro* para la identificación directa de *T. gondii*. En los resultados se muestran los resultados obtenidos de la estandarización de la PCR semi-anidada, así como el seguimiento del número de parásitos, células viables en el aislamiento *in vivo* e *in vitro* y la determinación de anticuerpos IgM e IgG en los ratones infectados a lo largo de este estudio.

PURIFICACIÓN DE DNA

La cantidad de taquizoitos utilizada para la purificación de DNA fue de 100 millones con una pureza y viabilidad de 98 y 92% respectivamente.

La pureza y la concentración del DNA genómico obtenido con la solución de lisis "casera" fue de 1.09 y 1.9 mg/mL respectivamente. Con la solución comercial de DNA-zol se obtuvo una pureza 1.73 y una concentración de 4.6 mg/mL. En la figura 8 se observa la integridad del DNA obtenido por éstas técnicas. De acuerdo a los resultados obtenidos, la técnica que se eligió para la purificación de DNA fue la solución comercial de DNA-zol (GIBCO).



A

B

Figura 8. Verificación de la integridad del DNA purificado en un gel de agarosa al 1%. A) Taquizoitos + solución de lisis, B) Taquizoitos + DNA-zol.

ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR SEMI-ANIDADA EN UNO Y DOS TUBOS

La estandarización de la PCR semi-anidada inicialmente se realizó en dos tubos al amplificar un segmento de 619 pb seguida de una segunda amplificación de un segmento más pequeño de 362 pb en un segundo tubo de reacción en dos corridas de 30 ciclos. Finalmente, se realizó la PCR semi-anidada en un solo tubo de reacción sin interrupción en una corrida de amplificación de 60 ciclos.

Para el diseño de la PCR semi-anidada en uno y dos tubos, fue necesario corroborar las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos TM1, TM2 y TM3, para la amplificación del gen B1 de *T. gondii*, siendo éstas de 68 °C, 68 °C y 48 °C respectivamente.

Se probaron diferentes concentraciones de dNTP's, Taq polimerasa y oligonucleótidos como se observa en las figuras 9,10,11 y 12.

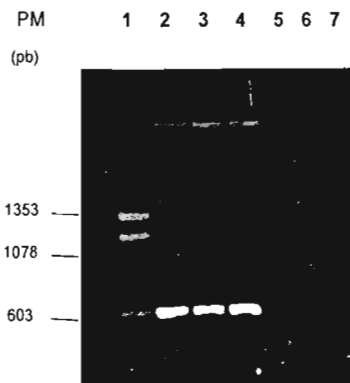


Figura 9. Diferentes cantidades de Taq polimerasa utilizadas en la estandarización de la PCR semi-anidada en uno y dos tubos. 1) Marcador de Peso Molecular, 2) 5 U, 3) 4 U, 4) 2.5 U, 5) DNA de células Vero, 6) y DNA de células D10, 7) agua desionizada.

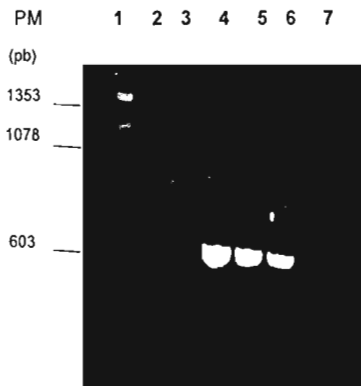


Figura 10. Diferentes concentraciones de dNTP's utilizadas en la estandarización de la PCR semi-anidada en uno y dos tubos. 1) Marcador de Peso Molecular, 2) DNA de células Vero, 3) DNA de células D10, 4) 0.5 mM, 5) 0.4 mM, 6) 0.2 Mm, 7) agua desionizada.

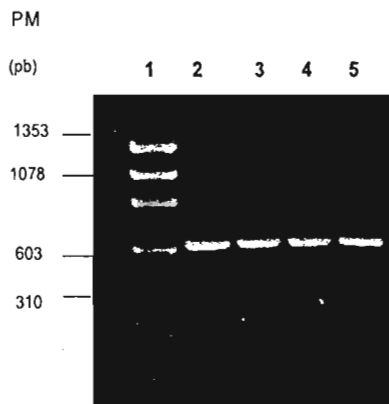


Figura 11. Diferentes diluciones de los oligonucleótidos TM1 y TM2 en la estandarización de la PCR semi-anidada de uno y dos tubos. 1) Marcador de Peso molecular, 2) 2.6 µg/µL, 3) 0.5 µg/µL, 4) 0.1 µg/µL, 5) 0.05 µg/µL.

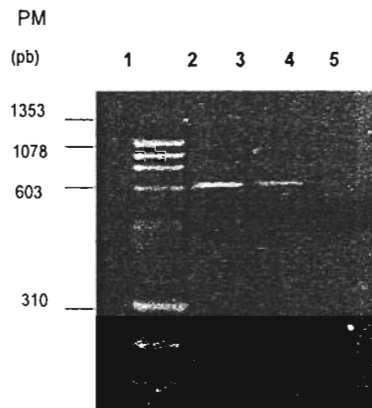


Figura 12. Diferentes diluciones de los oligonucleótidos TM1 y TM2 en la estandarización de la PCR semi-anidada de uno y dos tubos. Camil: 1) Marcador de Peso Molecular, 2) 0.026 µg/µL, 3) 0.013 µg/µL, 4) 0.007 µg/µL, 5) agua desionizada.

En las figuras 13 y 14, se muestran los productos finales para la PCR semi-anidada en uno y dos tubos, respectivamente. De acuerdo a los resultados observados, las concentraciones óptimas de los reactivos para la PCR semi-anidada en dos tubos fueron: 0.2 mM de dNTP's, 2.5 U de Taq polimerasa, 0.026 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de TM1, 0.026 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de TM2 y 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de TM3; por otro lado, las concentraciones óptimas para la PCR semi-anidada en un tubo fueron: 0.4 mM de dNTP's, 2.5 U de Taq polimerasa, TM1 de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, TM2 de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y TM3 de 0.06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

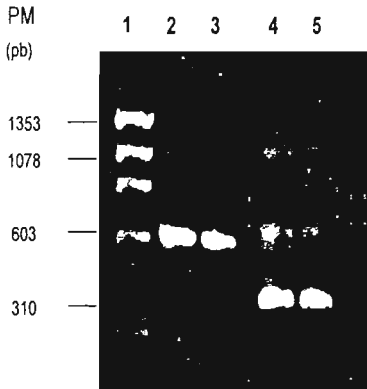


Figura 13. Condiciones óptimas para la PCR semi-anidada en dos tubos. 1) Marcador de Peso Molecular, 2 y 3) producto de la primera fase de la PCR semi-anidada de 619 pb 3 y 4) producto de 362 pb de la segunda fase de la PCR semi-anidada 5) agua desionizada.

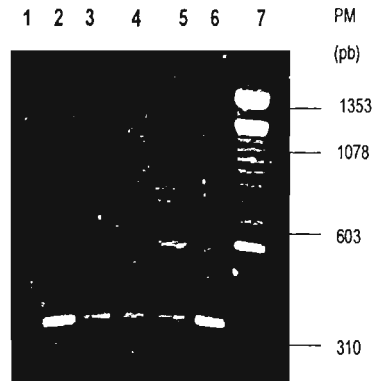


Figura 14. Condiciones óptimas para la PCR semi-anidada en un tubo. Carril: 1-6) producto de amplificación de 362 pb y se distingue ligeramente las bandas de 619 pb 7) Marcador de Peso Molecular.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la estandarización, los cuadros 3 y 4 muestran los cantidades, temperaturas y tiempo óptimos para la realización de la PCR semi-anidada en uno y dos tubos.

Cuadro 3. Cantidades óptimas de reactivos para la PCR semi-anidada en uno y dos tubos.

Reactivos	PCR-semi anidada en dos tubos		PCR semi-anidada en un tubo
Amortiguador 10X	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl ₂ (50mM)	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
dNTP's (10 mM)	1 µL	2 µL	1 µL
Oligo TM1 (1:50)	3 µL	—	3 µL
Oligo TM2 (1:50)	3 µL	3 µL	5 µL
Oligo TM3 (1:50)	—	3 µL	3 µL
DMSO 2%	1.5 µL	1.5 µL	1.5 µL
Taq polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
DNA <i>T. gondii</i>	5 µL	5 µL	5 µL
H ₂ O	28.5 µL	24.5 µL	28.5 µL
Volumen final	50 µL	50 µL	50 µL

Cuadro 4. Protocolo de temperaturas óptimas para la PCR semi-anidada en uno y dos tubos.

Protocolo de temperaturas en el termociclador			
PCR semi-anidada	En dos tubos		En un tubo
Etapas de amplificación	Temperatura, tiempo	Temperatura, tiempo	Temperatura, tiempo
Primera desnaturalización	95 °C, 3 min	95 °C, 3 min	95 °C, 3 min
Desnaturalización	94°C, 30 seg	94°C, 30 seg	94°C, 30 seg
Temperatura de alineamiento (annealing)	65°C, 30 seg	55°C, 30 seg	65°C, 30 seg
			55°C, 30 seg
Extensión enzimática	72°C. 1 min	72°C. 1 min	72°C. 1 min
Elongación	72°, 10 min	72°, 10 min	72°, 10 min
No. de ciclos	30	30	60
Producto de amplificación	619 pb	362 pb	362 pb

En las siguientes figuras se muestran los resultados se presentan los resultados obtenidos de la supervivencia, cuenta de taquizoitos, células viables y la determinación de los niveles de IgG e IgM del aislamiento *in vivo*. También se presentan los resultados del número de taquizoitos y células viables en los experimentos de aislamiento *in vitro*.

RESULTADOS DEL AISLAMIENTO *IN VIVO*

En la figura 15 se muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones infectados con diferentes cantidades de taquizoitos. Se observó que el 25% de los ratones infectados con 3,125 taquizoitos murieron el día 6 de infección y el 75% el día 7, todos los ratones infectados con 625 y 125 taquizoitos murieron al día 7 de infección. De los infectados con 25 taquizoitos, el 100% murieron al día 11; en cambio, todos los animales infectados con 1 y 5 taquizoitos sobrevivieron hasta el término del estudio, al igual que el grupo control.

En la infección *in vivo*, a los siete días de infección, se observó que la cantidad de taquizoitos en el líquido peritoneal se incrementó de acuerdo a la dosis inoculada, pero no existe una relación proporcional entre el número de taquizoitos inoculados y el número de parásitos cosechados (figura 16A). Cabe mencionarse que la viabilidad de los parásitos fue 100% en todos los casos en que se observaron. En el peritoneo de los ratones infectados con 1 y 5 parásitos todavía se observaron taquizoitos al día 14; a partir del día 24 ya no se observaron taquizoitos en estos dos grupos y los ratones vivieron hasta el día 56 que finalizó el protocolo de seguimiento.

En los grupos infectados con 25 taquizoitos o más no se observaron células viables al día 7 de infección (figura 16C); en cambio, para los grupos infectados con 1 y 5 taquizoitos y los controles, se observó una disminución en la viabilidad (figura 16B) al día 14 especialmente en el grupo infectado con 5 taquizoitos disminuyendo hasta el 60%, a partir del día 24 se aprecia una recuperación que se mantuvo hasta el final del estudio. El número de células peritoneales viables totales aumentaron en estos tres grupos hasta el día 34 de infección, seguida de una disminución al día 44, muy parecida entre el grupo control y el grupo infectado con 1 parásito, seguida de recuperación hasta el término del seguimiento; en cambio, en el grupo infectado con 5 parásitos esta disminución de células fue de mayor magnitud al igual que su recuperación (figura 16C).

Es de interés mencionar que no todos los ratones de cada grupo se infectaron, así que solo se tomaron en cuenta a los ratones infectados de cada grupo para obtener el promedio del número de taquizoitos, células viables y la determinación de los anticuerpos IgM e IgG.

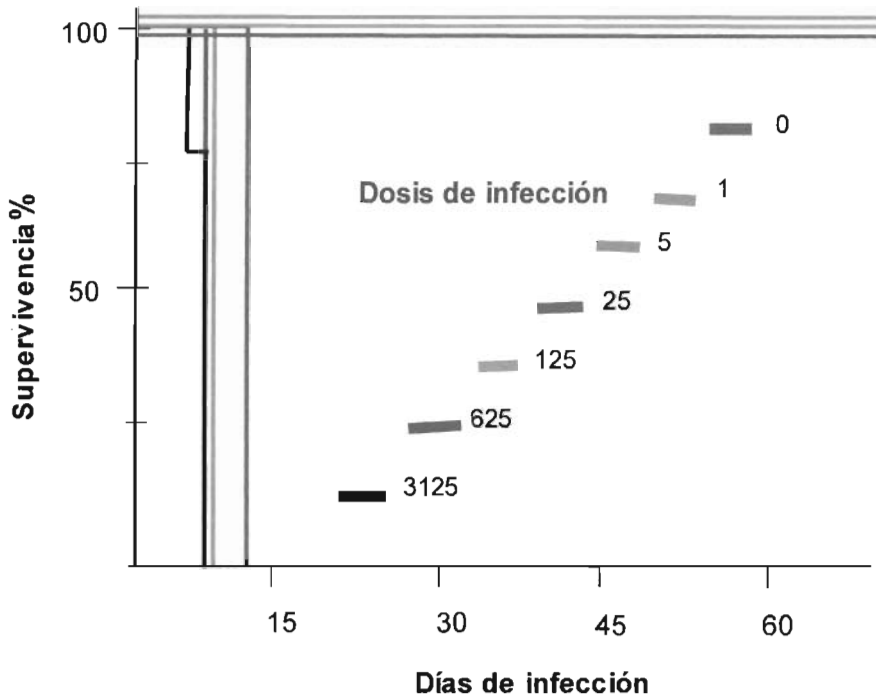


Figura 15. Resultados del porcentaje de supervivencia en el aislamiento *in vivo*.

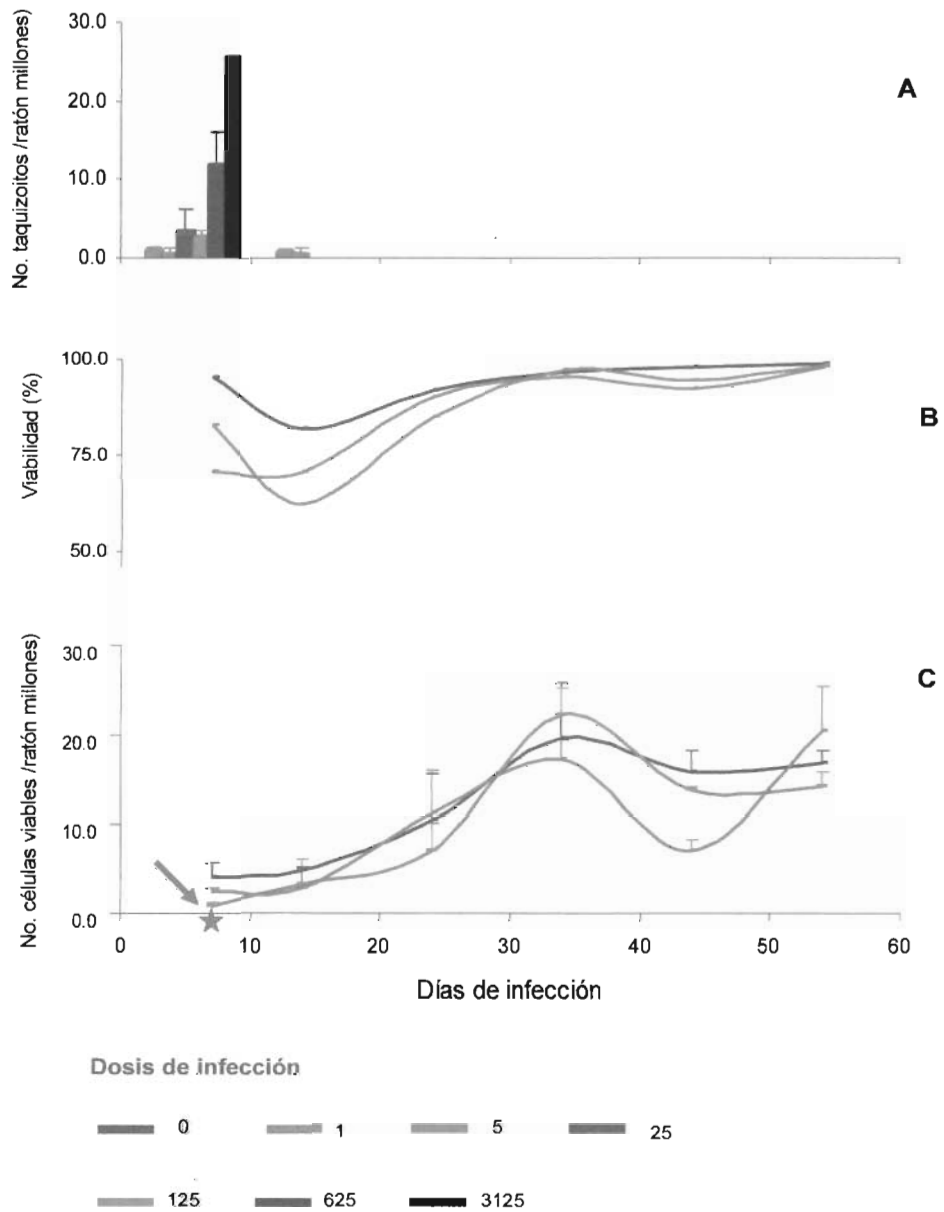


Figura 16. Resultados del número de taquizoitos extracelulares (A), viabilidad % (B) y número de células viables en el aislamiento *in vivo* (C).

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG E IgM

Como se observa en la figura 17 durante los primeros 7 días de infección en los grupos infectados con 1 y 5 taquizoitos, los niveles de IgM aparecen a partir del día 5 de infección, para el grupo infectado con 25 y 125 taquizoitos aparecen al día 4 y 2 respectivamente. Para los grupos infectados con 625 y 3125 aparecen al primer día del estudio (figura 17A). Por otro lado, los niveles de IgG en los grupos infectados con 1, 5 y 25 taquizoitos se observan a partir del día 7 y para los grupos infectados con 125, 625 y 3125 parásitos se observan a partir del día 2 de infección (figura 17B).

Los niveles de IgM se detectaron al los 7 días de infección en todos los grupos infectados con diferentes dosis de taquizoitos como se observa en la figura 18A; sin embargo, se observa que los niveles de IgM tienden a un incremento, como se observa con el grupo infectado con 25 parásitos. Con respecto, al grupo infectado con 1 taquizoito, los niveles de IgM se incrementaron teniendo su máximo al día 15 y fueron descendiendo a partir del día 24 hasta el final de la infección. Para el grupo infectado con 5 taquizoitos, se observa que los niveles igualmente se incrementaron presentando su máximo el día 25, seguido de una disminución a partir del día 34, manteniéndose estable hasta el día 44 y de nuevo fue disminuyendo hasta el final del estudio.

En los grupos infectados con 25, 125, 625 y 3125 taquizoitos se detectaron niveles de IgG solo al día 7 de infección, con tendencia a un incremento de los mismos (figura 18B). En el grupo infectado con 1 parásito, los niveles de IgG se detectaron a partir del día 7, teniendo un máximo al día 25 y un decremento a partir de día 36, manteniendo una tendencia estable hasta el final de la infección. Con el grupo infectado con 5 parásitos, los niveles de IgG se detectaron al día 7 de infección, manteniéndose estables entre el día 14 y 25, seguida de un aumento hasta el día 36 teniendo y una disminución a partir del día 46 hasta el término de la infección.

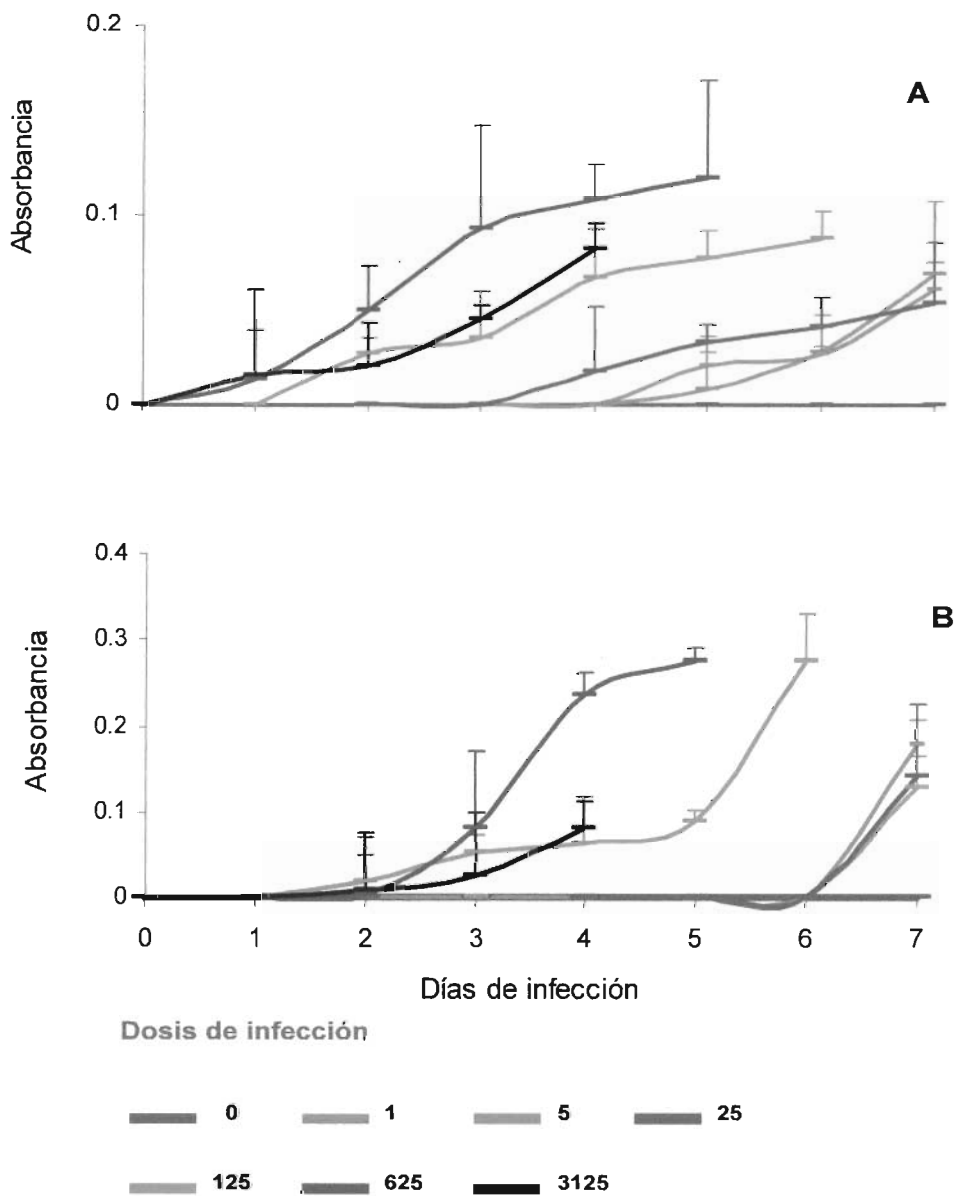


Figura 17. Resultados de la determinación de IgM (A) e IgG (B) en el aislamiento *in vivo* durante los primeros 7 días de infección.

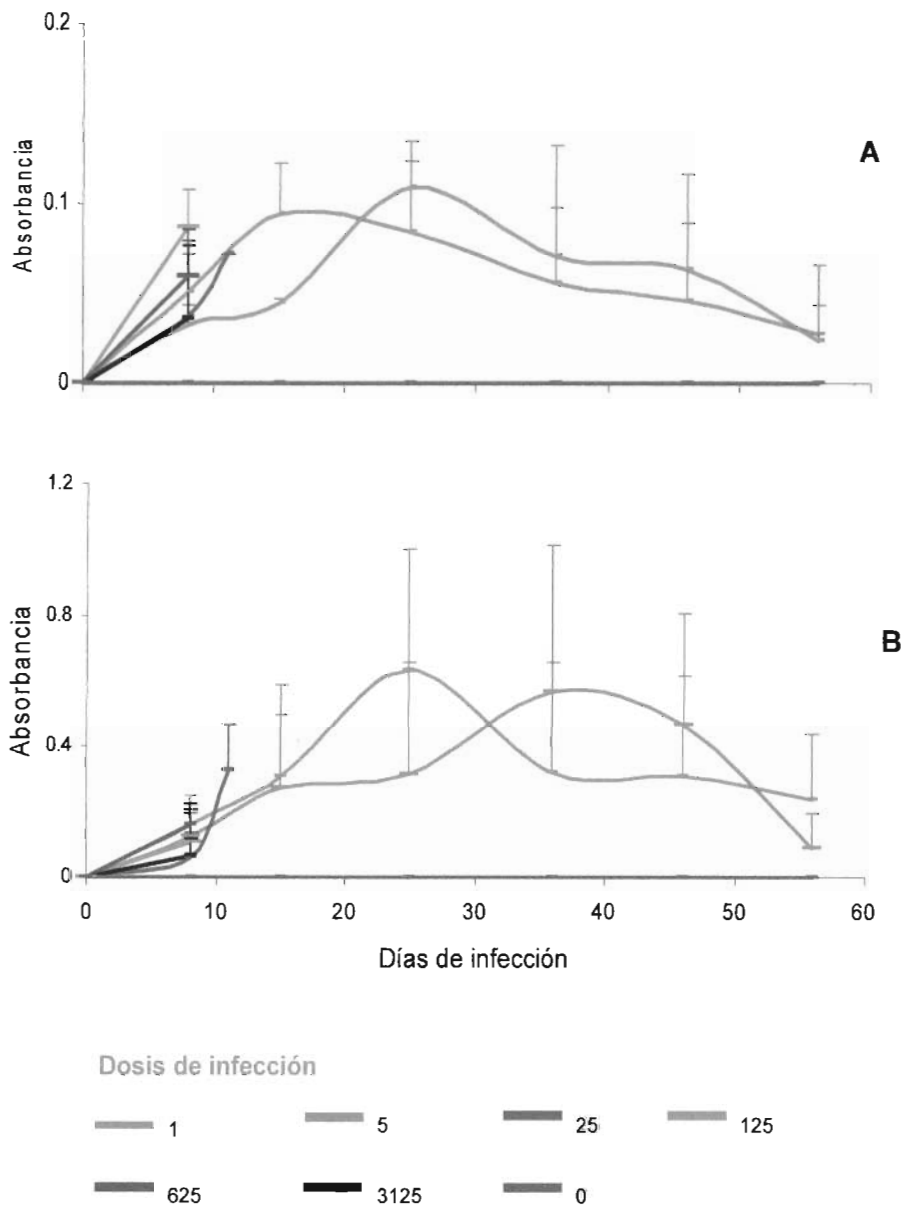


Figura 18. Resultados de la determinación de anticuerpos IgM (A) e IgG (B) en el aislamiento *in vivo* durante dos meses de infección.

RESULTADOS DEL AISLAMIENTO *IN VITRO*

En la figura 19 y 20 se muestran los resultados obtenidos del número de taquizoitos y células viables durante la infección de cultivos de células Vero, así como la viabilidad observada en los parásitos y células. Se observa que el número de taquizoitos se incrementó de acuerdo a la dosis de infección con periodos de mayor aumento de parásitos a los días 5, 20 y 35 y entre estos días, se observan etapas "en reposo" donde parece que el número de parásitos no varía. Los animales infectados con 3125 parásitos siguen el mismo comportamiento excepto al día 25 donde hubo una disminución considerable seguida de un aumento al día 30 que se mantuvo hasta el último día de infección (figura 19A). Con respecto a la viabilidad de los taquizoitos, se observa una disminución al día 5 de en todos los grupos infectados llegando hasta el 80 %, seguido de un aumento al día 10 y se observa otra disminución al día 15 con una recuperación de casi al 100% hasta el día 30 de infección manteniéndose hasta el término del estudio, esto se observa más claro en el grupo infectado con 1 taquizoito (figura 19B).

En la figura 20 se aprecia el porcentaje el conteo y la viabilidad de las células Vero. El número de células viables totales presentó una disminución de acuerdo a la dosis de infección durante todo el curso de la infección, comparándolo con en grupo control (figura 20A). Cabe mencionar que al igual que el aislamiento *in vivo* solo se tomaron en cuenta a los cultivos infectados para obtener los promedios de taquizoitos y células viables.

De acuerdo a la dosis de infección, se aprecia una disminución de la viabilidad con etapas de aumento y disminución que se presenta incluso en el grupo control, donde la viabilidad de las células varía entre el 100 y 60% a lo largo del estudio (figura 20B).

En la figura 21, se observa la correlación entre el número de taquizoitos cosechados y el número de células viables a lo largo de la infección, en esta se observa que al aumentar la cantidad de taquizoitos disminuyó la cantidad de células viables en los cultivos durante los primeros 15 días, habiendo buena correlación en todo el seguimiento, excepto al final.

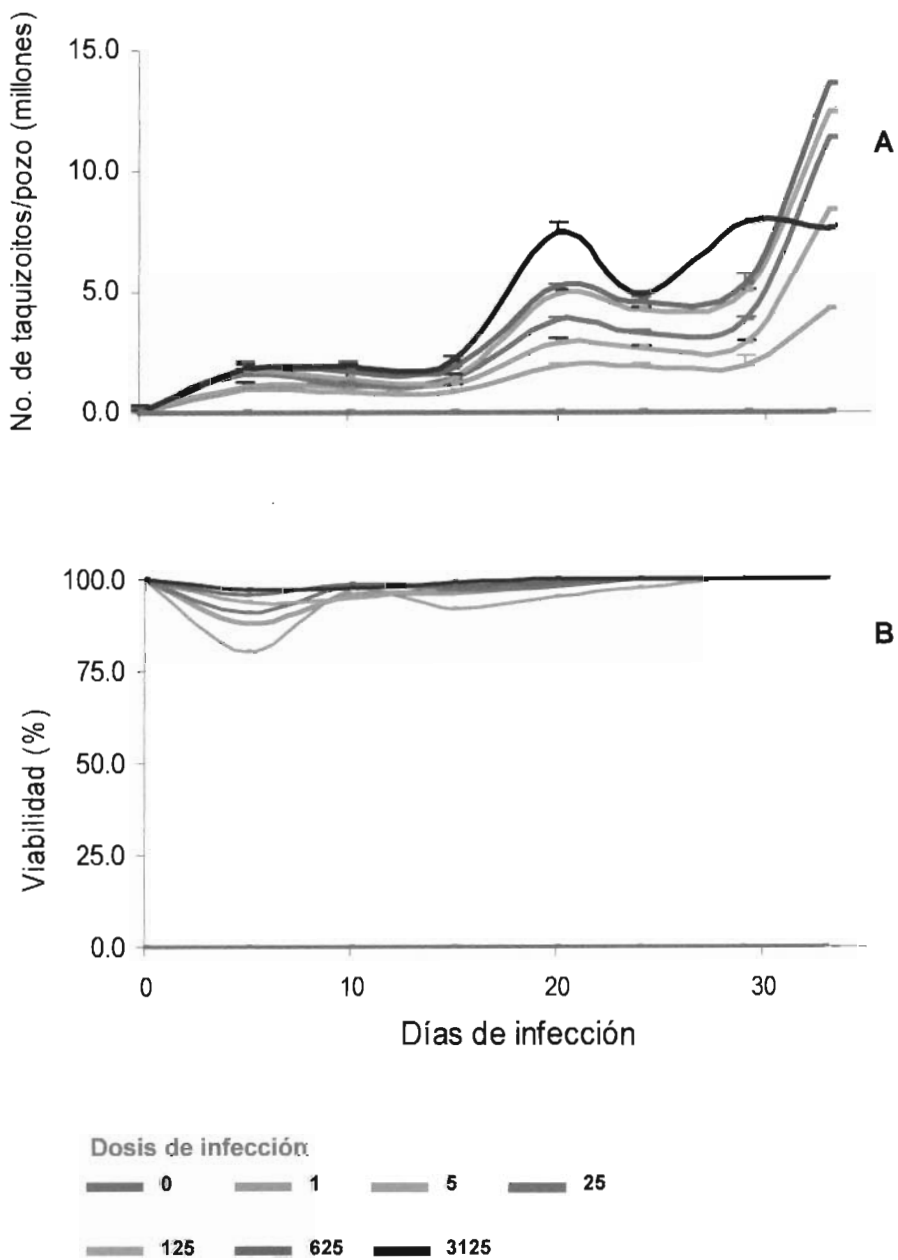


Figura 19. Resultados del número (A) y el % de viabilidad de taquizoitos extracelulares (B) en el aislamiento *in vitro*.

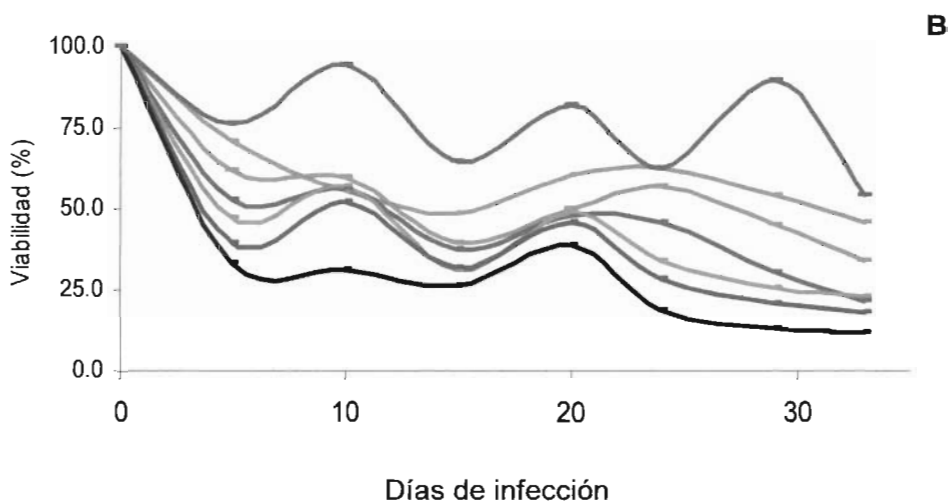
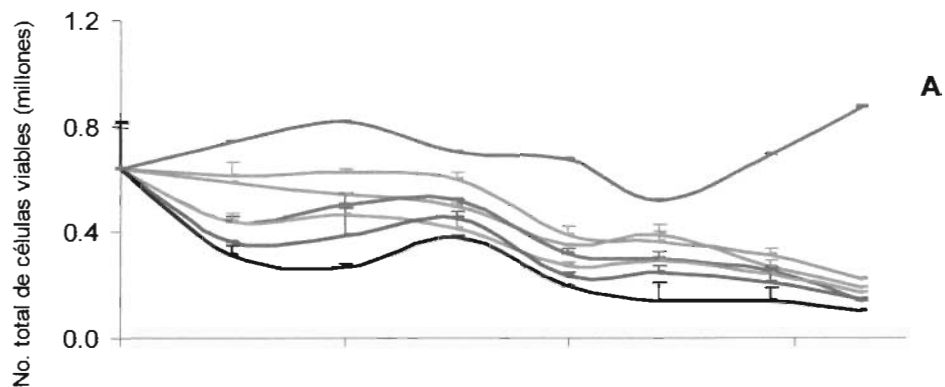


Figura 20. Resultados del número (A) y la viabilidad % (B) de células Vero en la infección *in vitro*.

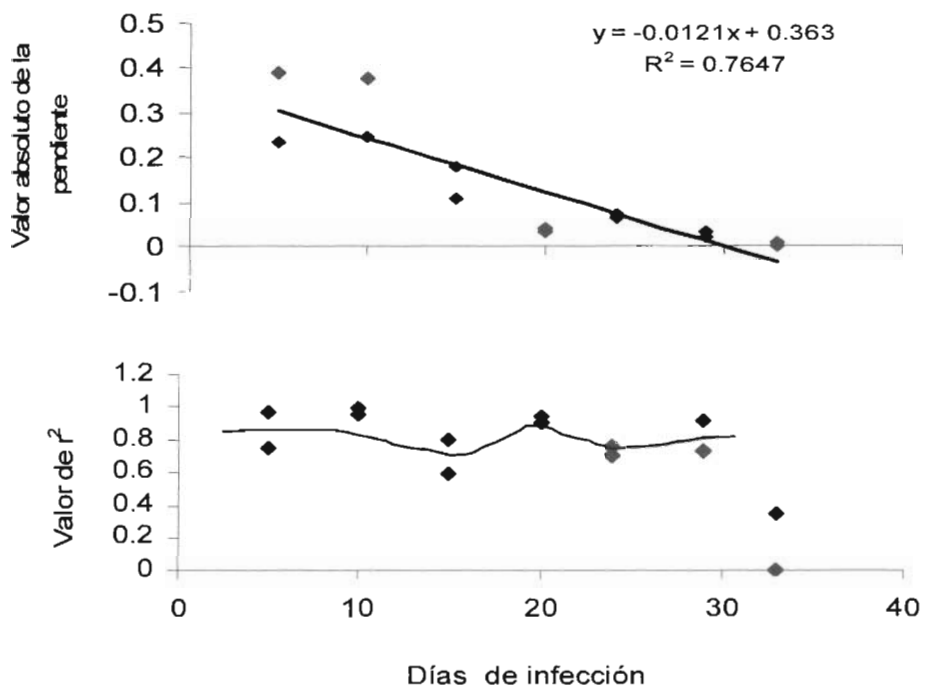


Figura 21. Resultados de la correlación inversamente proporcional entre el número de taquizoitos extracelulares y el número de células viables en el aislamiento *in vitro*.

RESULTADOS DE LA PCR SEMI-ANIDADA EN EL AISLAMIENTO *IN VIVO*

En el cuadro 5, se muestran resultados positivos de la PCR semi-anidada en un tubo a partir del día 7, con todas las dosis de taquizoitos probadas durante la infección. En las figuras 22 y 23 se muestran algunos ejemplos del DNA obtenido, así como del segmento de 362 pb resultante de la PCR semi-anidada de algunas de las muestras de la infección *in vivo*.

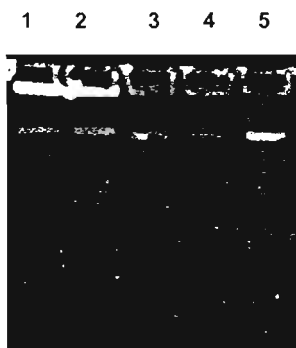


Figura 22. Muestras de DNA purificadas del líquido peritoneal de ratones infectados 1) 1, 2) 5, 3) 25, 4) 625 y 5) 3125 taquizoitos.

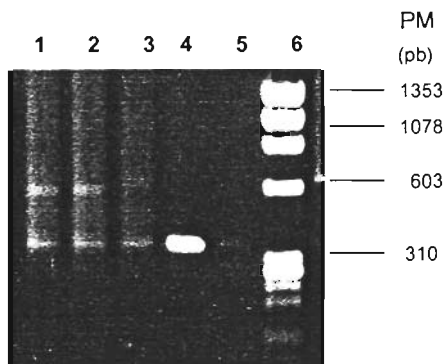


Figura 23. Productos de la PCR semi-anidada en un tubo. 1) 125, 2) 625, 3) 3125 taquizoitos, 4) DNA de taquizoitos puros (Control+), 5) 1 taquizoito, 6) Marcador de Peso Molecular.

Cuadro 5: Resultados de el número de taquizoitos y de la PCR semi-anidada en un tubo de la infección *in vivo*.

No. taquizoitos inoculados	No. de ratones	Días de muestreo																			
		7		11		14		25		36		46		56							
		No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +						
0	1	0.0	+			0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+						
	2		+													+	+	+	+	+	+
	3		+													+	+	+	+	+	+
	4		+													+	+	+	+	+	+
1	1	1.2	+			0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+						
	2	1.0	+													+	+	+	+	+	
	3	0.0	=													=	=	=	=	=	
	4	0.6	=													=	=	=	=	=	
	5	0.0	=													=	=	=	=	=	
	6	0.0	=													=	=	=	=	=	
5	1	0.2	+			0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+						
	2	0.0	=													=	=	=	=	=	
	3	1.0	+													+	+	+	+	+	
	4	0.0	=													=	=	=	=	=	
25	1	5.4	+			0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+						
	2	0.0	=													=	=	=	=	=	
	3	0.0	=													=	=	=	=	=	
	4	1.6	+													+	+	+	+	+	
125	1	2.4	+			0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+						
	2	3.8	+													+	+	+	+	+	
	3	2.4	+													+	+	+	+	+	
	4	2.6	+													+	+	+	+	+	
625	1	18	+			0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+						
	2	9.4	+													+	+	+	+	+	
	3	10	+													+	+	+	+	+	
	4	9.8	+													+	+	+	+	+	
3125	1	n.d.	n.d.			0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+	0.0	+						
	2	25.6	+													+	+	+	+	+	
	3	n.d.	n.d.													+	+	+	+	+	
	4	n.d.	n.d.													+	+	+	+	+	

n.d. (no se detectaron por muerte del ratón).

RESULTADOS DE LA PCR SEMI-ANIDADA DEL AISLAMIENTO *IN VITRO*

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos de la PCR semi-anidada en un tubo de la infección *in vitro*, con resultados positivos a partir del día 5, con todas las dosis de taquizoitos probadas durante la infección, como se muestra en las figura 24 el DNA obtenido de algunas de las muestras y en la figura 25 se aprecia la banda de 362 pb correspondiente al gen B1 de *T. gondii*.

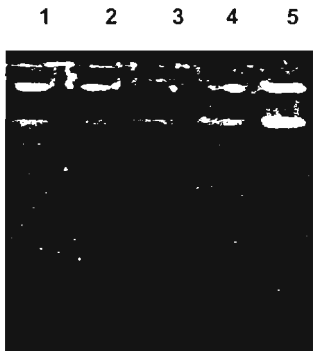


Figura 24. Muestras de DNA purificadas de los cultivos de células Vero infectados con 1) 1, 2) 5, 3) 125, 4) 625, 5) 3125 taquizoitos.

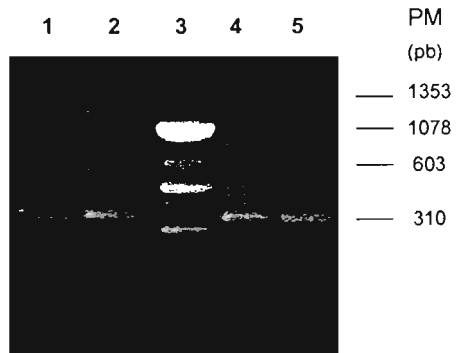


Figura 25. Productos de la PCR semi-anidada en un tubo. 1) 1, 2) 5 taquizoitos, 3) Marcador de Peso Molecular 4) 3125 taquizoitos, 5) DNA de taquizoitos (Control +).

Cuadro 6: Resultados de el número de taquizoitos y de la PCR semi-anidada en un tubo de la infección *in vitro*.

No. taq inoculados	No. de cultivos	Días de muestreo													
		5		10		15		20		24		29		33	
		No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +	No. taq X10 ⁶	PCR +
0	1		-		-		-		-		-		-		-
	2	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-
	3		-		-		-		-		-		-		-
1	1	0.71	+	0.71	+	0.75	+	1.78	+	2.05	+	1.9	+	4.01	+
	2	0.71	+	0.71	+	0.75	+	1.78	+	2.05	+	1.9	+	4.01	+
	3	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1	1.1	+	1.15	+	0.96	+	2.77	+	2.5	+	2.8	+	8.38	+
	2	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0.8	+	0.95	+	1.2	+	2.8	+	2.8	+	3.0	+	8.5	+
25	1	1.6	+	1.25	+	1.15	+	3.76	+	3.4	+	3.9	+	11.3	+
	2	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	1.3	+	1.05	+	1.45	+	3.65	+	3.16	+	3.75	+	11.5	+
125	1	1.8	+	1.6	+	1.2	+	5.01	+	4.35	+	5.05	+	12.4	+
	2	1.3	+	1.07	+	1.56	+	4.79	+	4.13	+	4.95	+	12.5	+
	3	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
625	1	1.9	+	1.9	+	1.45	+	5.22	+	4.6	+	5.5	+	13.8	+
	2	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	1.6	+	1.4	+	2.1	+	5.14	+	4.5	+	5.2	+	13.3	+
3125	1	2.0	+	2.0	+	2.11	+	7.45	+	4.75	+	7.6	+	7.75	+
	2	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	1.4	+	1.8	+	2.15	+	7.5	+	5.0	+	8.15	+	7.6	+

DISCUSIÓN

La detección directa de *Toxoplasma gondii* es importante en casos de transmisión vertical, de reactivación por inmunodepresión o en muestras de cadáver o de alimentos contaminados.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes son buenos complementos para el aislamiento *in vivo* e *in vitro* en el diagnóstico de la toxoplasmosis, por su alta sensibilidad y especificidad. El gen B1 es un blanco muy utilizado para la detección del parásito, ya que cuenta con 35 copias en su genoma a diferencia de otros blancos, como el gen SAG1 que sólo tiene una copia.¹²² La PCR semi-anidada cuenta con un oligonucleótido extra, el cual flanquea un segmento de DNA más pequeño y lo amplifica millones de veces más, lo cual hace que aumente la sensibilidad y especificidad de la prueba;¹¹⁵ la estandarización de la PCR semi-anidada en uno y dos tubos se basó en lo reportado por estos autores, usando las temperaturas reportadas por ellos, aunque se probaron diferentes concentraciones de los reactivos. La sensibilidad de esta PCR fue menor a lo que los autores reportan, pues ellos detectan el DNA equivalente a 0.1 parásitos, mientras que nosotros detectamos desde 3,125. La PCR es un método que depende de varios factores, como la concentración de los reactivos; de hecho las mejores concentraciones fueron más bajas que las reportadas. Por otro lado, la presencia de contaminantes puede inhibir a la Taq polimerasa, como es el caso de algunos agentes quelantes; cabe mencionarse, en este sentido, que la solución de lisis preparada en el laboratorio contiene EDTA, y por ello no se obtuvieron buenos resultados en comparación con el DNA-zol. Por otro lado, la presencia de DNA contaminante puede introducir errores en la reacción, por lo que actualmente se utilizan sistemas para prevenir la contaminación de una PCR, como es la utilización de la enzima Uracil N-glicosilasa y dUTP en lugar de dTTP, pero en este estudio no fue posible hacer esto.^{114,115}

Otra causa podría ser que las temperaturas óptimas de actividad de la enzima y de alineamiento de los iniciadores no hayan sido adecuadas en nuestras condiciones, pues aunque se comprobó el cálculo de las Tm's, podría ser que la altura de la ciudad de México las cambie, ya que la presión afecta aspectos como la velocidad de una reacción, la solubilidad y afinidad de los reactivos.

La prueba de PCR se ha ensayado en diferentes muestras biológicas como el líquido amniótico, placenta, sangre de cordón para el diagnóstico de la infección congénita en mujeres embarazadas y en muestras como líquido bronco-alveolar, líquido cefalorraquídeo y sangre de pacientes con VIH/SIDA, en órganos de donadores cadavéricos, en muestras de carnes y embutidos para evitar la transmisión del parásito por vía oral.¹²⁰⁻¹²⁵ En este estudio se sometieron muestras de líquido peritoneal y sobrenadante de cultivo celular con diferentes cantidades de parásitos, con el fin de verificar su ejecución con muestras similares a las que se usan para diagnóstico clínico.^{101,102,107}

La sensibilidad de la PCR semi-anidada en los fluidos cosechados de los experimentos *in vivo* e *in vitro* fue aproximadamente de 100,000 parásitos, pero sólo se observaron estas cantidades en dos ratones; hubo una muestra con 600,000 parásitos con un resultado negativo en la PCR, debido probablemente a la contaminación de la misma por lo que deberá corroborarse esto. Cabe mencionar que se utilizó el método de dilución limitante para la infección y no todos los ratones de cada grupo se infectaron.

En este estudio podemos indicar que los aislamientos *in vivo* e *in vitro* son confiables para la detección del parásito con la cepa RH aún infectados con dosis bajas, con el inconveniente de requerir más tiempo para observar un resultado positivo que la PCR, ya que ésta puede dar resultados positivos o negativos en horas. El aislamiento *in vivo* tiene la ventaja de detectar anticuerpos de tipo IgM e IgG para corroborar la infección, como se demostró en este estudio, en el cual el 100% de los ratones infectados se detectaron anticuerpo IgM e IgG contra *Toxoplasma gondii*, por esta razón se ha mencionado ser mejor que el aislamiento *in vitro* e incluso mejor que la PCR

dependiendo de la virulencia de la cepa, ya que en cepas no virulentas la detección de parásitos puede tardar hasta 60 días para encontrarlos enquistados en algún órgano. El aislamiento *in vitro* tienen el inconveniente de contaminación por el manejo, ocasionando resultados negativos. Otro inconveniente en el manejo de ambos modelos es la posibilidad de tener un accidente de trabajo, por lo que se recomienda que se trabaje en laboratorios especiales o de investigación.

Para el aislamiento *in vitro* de *T. gondii* se han utilizado varios tipos de células como las células Vero y los fibroblastos MRC5.¹⁵² El inóculo inicial y la virulencia de la cepa son determinantes en los resultados; en el caso de cepas virulentas como la RH podemos observar al parásito a partir del segundo día de infección, mientras que para una cepa no virulentas puede tardar hasta semanas la observación de un resultado positivo.¹⁰⁶

El aislamiento en ratones es considerado uno de los métodos más sensibles para la identificación de *T. gondii* de muestras de tejidos o fluidos biológicos contaminadas con el parásito. La susceptibilidad de los ratones a este parásito depende de la ruta, la virulencia y la carga parasitaria. Por esto se decidió realizar experimentos de cinética de infección en ratones, con diferentes dosis de parásitos y seguimiento serológico. En esta tesis se confirmó que la dosis de infección influyó en la cantidad de taquizoitos cosechados y el tiempo de supervivencia de los ratones, pues sólo sobrevivieron aquellos inoculados con muy bajas dosis. Cabe resaltar que con cantidades tan bajas como 25 taquizoitos, los ratones fueron incapaces de controlar la infección, y murieron a los 11 días. Esto fue inusitado, pues no hay estudios previos de infección experimental con tan bajas dosis, pero refuerza la alta virulencia de esta cepa para los ratones.

Un aspecto por demás interesante fue la diferencia entre el número de parásitos obtenido y el esperado. Por ejemplo, con infecciones de 1 taquizoito, considerando que éste es capaz de replicarse cada 4 a 6 horas (bilbio), la cantidad esperada de parásitos a los 7 días debería ser de 2.68×10^8 a 4.40×10^{12} parásitos, y aun en los ratones infectados con 3,125 parásitos se cosecharon menos de 30 millones de parásitos; la explicación de esto es doble:

por un lado, sólo se contaron los parásitos libres en peritoneo, y el ratón debía tener taquizoitos en tejidos diversos,¹⁰¹ pues forman rosetas de 16 a 32 antes de destruir a la célula hospedera y liberarse; por otro lado, los ratones activan su sistema inmunológico para combatir a los parásitos, lo que se demostró con la respuesta de anticuerpos.

Esta respuesta sin embargo, no fue suficiente para contrarrestar al parásito en los ratones infectados con 25 parásitos o más, los cuales posiblemente invadieron rápidamente órganos vitales como los pulmones, el bazo, el corazón y el cerebro, provocando enfermedad con la disminución de peso, falta de movimiento y coordinación, hasta su muerte.^{101.102.107} El tiempo de vida de los ratones infectados con 3,125 parásitos fue de 7 días, congruente con lo reportado para roedores expuestos a 5,000 parásitos la cepa RH (6 a 10 días).¹⁰⁹

También la producción de anticuerpos dependió del tamaño del inóculo, pues a dosis más altas la respuesta fue más rápida, tanto en el caso de la IgM como en el de la IgG. La excepción fue el grupo de ratones inyectados con 3,125 taquizoitos, pues la producción de anticuerpos aparentemente fue más lenta que la de aquellos con infecciones de 625, 125, 25 taquizoitos. Lee y colaboradores reportan que la infección de ratones con la cepa RH no se detectaron niveles de IgM e IgG en los primeros días y con una cepa no virulenta a los días 10 y 15 de la infección.¹⁵³ En el grupo infectado con 3125 taquizoitos la respuesta fue menor, comparada con los demás grupos, posiblemente debido a el fenómeno de la "tolerancia inmunológica", donde se satura el sistema inmune por la gran cantidad de parásitos presentes y por lo tanto, disminuye la respuesta inmune del ratón.

También en el cultivo *in vitro* se observó que conforme aumenta la dosis de infección aumenta el número de taquizoitos cosechados. El parásito se adaptó a las condiciones del cultivo, pues hubo periodos de incremento de taquizoitos libres con la consecuente disminución de células viables, y esto se relacionó con la dosis de infección; después se observaron mesetas en el número de parásitos libres, en los cuales las células tuvieron recuperación o estabilidad.

En los cultivos infectados con 3125 parásitos el incremento de taquizoitos tubo un efecto drástico sobre células viables. De hecho se encontró una fuerte correlación inversa entre el número de taquizoitos cosechados y el número de células viables en los primeros 15 días de infección; este valor disminuyó probablemente debido a la gran cantidad de células muertas.

CONCLUSIONES

El gen B1 resultó ser un buen blanco para la detección directa de *Toxoplasma gondii*. La PCR semi-anidada estandarizada tuvo una alta especificidad aunque debe mejorarse su sensibilidad, la obtención de resultados fue más rápida que los modelos *in vivo* e *in vitro*.

Con este trabajo se obtuvieron resultados inesperados, ya que la cepa RH fue más virulenta de lo reportado en la literatura, lo que nos hace pensar que los modelos *in vivo* e *in vitro* nos permitirán aislar y detectar en tiempos cortos al parásito, al igual que la serología, aun en dosis muy bajas con cepas del genotipo I. Con estos procedimientos se apoya el diagnóstico de la transmisión congénita y de la reactivación en personas inmunocomprometidas, por lo que deben implementarse no sólo en los laboratorios de investigación sino en los de rutina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Galván Ramírez ML y Mondragón Flores R. Toxoplasmosis Humana, Ediciones Cuellar, México. 2001. Primera edición. Capítulo 1. Taxonomía y ultraestructura.
2. Ambroise-Thomas P and Petersen E. Congenital toxoplasmosis. Scientific Background, Clinical Management and Control. Ed. Springer-Verlag Francia. 2000. pp 324.
3. Mollinedo Pérez Sergio. TOXOPLASMOSIS. 2004. Galenored.com 2004.
4. Miles HB, McCabe RE, Wong SY. Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandel, Douglas and Bennett's Fourth Edition. Churchill and Livingstone edit.1995.
5. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin. Microbiol. Rev. 1998;11:267-299.
6. Dubey J.P, Miller N & Frenkel J.K. Characterization of the fecal form of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 1970; 56:447-456.
7. Ferguson DJ. Hutchinson WM. & Siim JC. The structural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathologica en Microbiologica Scandinavica 1975,83:491-505.
8. Chobotar B & Schotyseck E. Ultrastructure. In "The Biology of the Coccidia" P. L. Long Univ. Park Press Baltimore. 1982: 101-165.

9. Nichols BA and Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. 1987;34:317-326.
10. Speer CA., Clark S and Dubey JP. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 1998;84;3:505-512.
11. Hutchison, WM & Dunachie J. The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1971;65:380-399.
12. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.
13. Dubey JP. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 1988;28:1019-1024.
14. Mondragón-Flores R. Ciclo de vida. En: Galván-Ramírez ML, Mondragón-Flores R. Toxoplasmosis humana. Ed. Cuéllar. México DF, México. 2001: 45-54.
15. Frenkel JK. Biology of *Toxoplasma gondii*. En: Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Ambroise-Thomas P, Petersen E. Ed. Springer-Verlag, Paris, Francia. 2000: 9-25.
16. Correa D, Cañedo I, Hernández JL, Coballase E. *Toxoplasma gondii*: un parásito oportunista En: Zoonosis Emergentes y Reemergentes. Bacterias, Parásitos, Virus, Hongos y Priones. Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2001 (libro electrónico).
17. Tenter AM, Heckeroth AR and Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 2000;30: 1217-1258.

18. Sierra M, Bosch J, Juncosa T, Matas L, Muñoz C. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. Control de Calidad SEIMC.
19. Singh S. Mother-to-child transmission and diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. Ind. J. Med. Microbiol. 2003; 21: 69-76.
20. Picazo J and Fuertes A. Protocolos Clínicos de Diagnóstico Serológico Comentado. Cortesía de Innogenetics Diagnóstica y Terapéutica, S.A. Parasitología al día. 1998: 6.
21. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. Clin. Infect. Dis. 1994; 18:853-862.
22. Dupouy- Camet J, Lavareda de Souza S, Maslo C, Paugam A, Saimot A G, Benarous R, Tourte-Schaefer C, Derouin F. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous Blood from AIDS patients by Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 1993;31:1866-1869.
23. Waser M, Maggiorini M, Luthy A, Laske A, Von Segesser L, Mohacsi P, Opravil M, Turina M, Follath F, Gallino A. Infectious complications in 100 cosecutive heart transplant recipients. Eur. J. Clin. Microbiol. 1994;13:12-18.
24. Pendry K, Tait A, McLay D, Yen D y A K Burnett. Toxoplasmosis after BTM for CML. Bone Marrow Transplant. 1990;5:65-67.
25. Slavin MA, Meyers JD, Remington JS. *Toxoplasma gondii* infection in bone marrow trasplant recipient : A 20 year experience. Bone Marrow Trasnplant 1994;13:549-557.
26. Tschirhart D, Klatt S. Disseminated toxoplasmosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch. Pathol. Lab. Med. 1988, 112: 1237-1241.

27. Gallino A, Maggiorini M, Kiowski W, Martin X, Wunderli W, Schneider J. Toxoplasmosis in heart transplant recipients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996;15:389-393.
28. Carrada-Bravo T. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1983; 40:353-362.
29. Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Calindo-Virgen S, Magos C, Llausás A, Tapia-Conyer R, Gutiérrez G, Sepúlveda J. Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. Sal. Púb. Méx. 1991;34: 222-229.
30. Galván ML, Soto JL. Incidente of anti-toxoplasma antibodyes in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. Revista de la Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1995;28:333-337.
31. Galván Ramírez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in blood donors of Jalisco, Mexico. Transfusión 2005;45:281-282.
32. Vela- Amieva M, Cañedo Solares I, Gutiérrez-Castrejón P, Pérez-Andrade M, González- Contreras C, Ortiz-Córtés J, Ortega-Velazquez V, Galván Ramírez ML, Ruiz García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C, Correa D. Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005;72:142-144.
33. Aspinall T.V , Maelee D, Hyde J.E, Sims P.F.G. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in comercial meta products as monitored by polymerase Chain reaction food for thought?. Int. J. Parasitol. 2002;32:1193-1199.

34. Howe DK, Honore S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 1997;35:1411–1414.
35. Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human Toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. J. Clin. Microbiol. 2001:1566-1570.
36. Lucas SR, Hagiwara MK, Loureiro V, Ikesaki JY, Birgel EH. *Toxoplasma gondii* infection in Brazilian domestic outpatient cats. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1999; 41:221-224.
37. Hubbard G, Witt W, Healy M, Schmidt R. An outbreak of toxoplasmosis in zoo birds. Vet. Pathol. 1986;23:639-641.
38. Murata K. A serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in zoo animals and other animals. Nippon Jjuigaku Zasshi. 1989.;51:935-940.
39. Hove T, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of domestic pigs and some wild game species from Zimbabwe. J. Parasitol. 1999;85:373-373.
40. Tizar IR, Harneson J, Lai C. The prevalence of serum antibodies to *Toxoplasma gondii* in Ontario mammals. Can. J. Comp. Med. 1978;42:177-183.
41. Childs JE, Seegar WS. Epidemiologic observations on infection with *Toxoplasma gondii* in three species of urban mammals from Baltimore, Maryland, USA. Int. J. Zoonoses. 1986; 13:249-261.

42. Mirdha BH, Samantaray Jc, Pandey A. Seropositivity of *Toxoplasma gondii* in domestic animals. Ind. J. Public Health. 1999; 43:91-92.
43. Van der Puije WN, Bosompem KM, Canacoo EA Et.al. The prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Ghanaian shepp and goats. Acta Trop. 21.2000.;76:21-26.
44. Hugh-Jones ME, Broussard J, Stewart TB et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in southern Louisiana swine in 1980 and 1981. Am. J. Vet. Res. 1986;47:1050-1051.
45. Riemann HP, Smith AT, Stormont C. Equine toxoplasmosis: a survey for antibodies to *Toxoplasma gondii* in horses. Am. J. Vet. Res. 1975;36:1797-1800.
46. Dubey JP, Scandrett WB, Kwok OC, Gajadhar A. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in ostriches (*Struthio camelus*). J. Parasitol. 2000;86:623-624.
47. Harttley WJ, Dubey JP. Fatal toxoplasmosis in some native Australian birds. J. Vet. Diagn. Invest . 1991;3:167:169.
48. Cadavid AP, Canas L, Estrada JJ, Ramirez LE. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in Cebu spp in the Santa Fe Zoological Park of Medellin, Colombia. J. Med. Primatol. 1991;20:259-261.
49. Quist CF, Dubey JP, Luttrell MP, Davidson WR. Toxoplasmosis in wild turkeys: a case report and selologic survey. J. Wild. Dis. 1995;31:255-258.
50. El-Massry A, Mahdy OA, El-Ghaysh A, Dubey JP. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in sera of turkeys, chickens and ducks from Egypt. J. Parasitol. 2000;86:627-628.

51. Alosi C, Iannuzzi L. Spontaneous acute toxoplasmosis of pigeons. Indication of a focus of infection at Messina. *Acta Med. Vet.* 1966;12:265-273.
52. Dubey JP, Garner MW, Willette MM, et al. Disseminated toxoplasmosis in magpie geese (*Anseranas semipalmata*) with large numbers of tissue cysts in livers. *J. Parasitol.* 2001;87:219-23.
53. Mason RW, Hartley WJ, Dubey J. Lethal toxoplasmosis in a little penguin (*Eudyptula minor*) from Tasmania. *J. Parasitol.* 1991;77:328-330.
54. Work TM, Massey JG, Rideout BA. Fatal toxoplasmosis in free-ranging endangered Alala from Hawaii. *J. Wild. Dis.* 2000;36:205-212.
55. Dubey J.P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1980;177:1203-1207.
56. Dubey JP, Sharma SP, Juranek DD, Sulzer A.J, Teutsch SM. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from an outbreak of Toxoplasmosis in Atlanta, Georgia. *Am. J. Vet. Res.* 1981;42:1007-1010.
57. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 2001;184:633 – 639.
58. Dubey JP, Graham H, De Young R, Dahl E, Eberhard M, Nace E, Won K, Bishop H, Punkosdy C, Sreekumar C, Vianna M, Shen S, Kwok O, Sumners J, Demaris S, Humphreys J, Lehmann. Molecular and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in the United States. *J. Parasitol.* 2004;1:67-71.

59. Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 1992;359: 82-85.
60. Bermann V, Heidrich R, Kiupel H. Acute toxoplasmosis outbreak in rabbit flocks. *Angew. Parasitol*. 1980;21:1-6.
61. Dhillon AS, Thacker HL, Winterfield RW. Toxoplasmosis in mynahs. *Avian. Dis*. 1982;26:445-449.
62. Dubey JP, Rommel M. Abortions caused by protozoa in agricultural animals. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr*. 1992;99:355-362.
63. Guerrero OM, Chinchilla M, Castro A. Age influence in the natural resistance of white rat and mine to protozoan *Toxoplasma gondii*. *Revista de Biología Tropical*. 1995;43:27-30.
64. Dubey JP, Graham DH, Blackston CR, Lehmann T, Gennari SM, Ragozo AM, Nishi SM, Shen SK, Kwok OC, Hill DE. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from San Paulo Brazil: unexpected findings. *Int. J. Parasitol*. 2002; 32:99-105.
65. Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Hilali M, El-Ghaysh A, Sreekumar C, Kwok OC, Shen SK, Lehmann T. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. *Vet. Parasitol*. 2003;114:89-95
66. Dubey JP, Venturini L, Piscopo M, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Vianna C, Lehmann T. Isolation and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. *J. Parasitol*. 2003:1063-1064.
67. Dubey JP, Morales ES, Lehmann. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Free-Ranging chickens from México. *J. Parasitol*. 2004:411-413.

68. Hegab SM and Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of Toxoplasmosis. Clin. Exp. Med. 2003;3:84-105
69. Nichols BA., Chiappino ML. & O'Connor GR. Secretion from the rophtics of *Toxoplasma gondii* during host cell invasion. J. Ultrastruct. Res. 1983;83:85-98.
70. Werk R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cell. Rev. Infect. Dis. 1985;7:449-457.
71. Wilson CB, Remington CS. Activity of human blood leukocytes against *Toxoplasma gondii*. J. Infect. Dis. 1979;140:890-895.
72. Sibley L.D, Krahenbu HL. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of 32 kDa protein. Europ. Cell. Biol. 1988;47:81-87.
73. Remington JS, Krahenbuhl J. Immunology of *Toxoplasma gondii*. In immunology of human infection. Part II Nahmias and O'Reilly(ed) Philadelphia Plenum Publishing Corporation. 1982: 327-363.
74. Jacobiec FA, Lefkowitz J, Knowles DM. B- and T- lymphocytes in ocular disease. Ophthalmology. 1984;91:635-654.
75. Roberts F, Roberts CW, Ferguson DJ, Mcleod R. Inhibition of nitric oxide production exacerbates chronic ocular toxoplasmosis. Parasite Immunol. 2000;22:1-5.
76. Reiner NE. Altered cell signaling and monocular phagocytic deactivation during intracellular infection. Immunol. Today, 1994;15:374-381.

77. McCabe RE, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Douglas R Jr, Bennett JE (eds) Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed. Churchill Livingstone.1990:140-260.
78. Jones TC, Yeh S, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. J. Exp. Med. 1972;136:1157-1172.
79. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin. Microbiol. Rev. 1998;4:569-588.
80. Gorgievsky - Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 1996; 34:1506-1511.
81. Derouin F, Leport C, Pueyo S, Morlat Ph, Letrillart B, Chêne G, Ecobichon JL, Luft B, Aubertin J, Hafner R, Vildé JL, Salomon R. Predictive value of *Toxoplasma gondii* antibody titres on the occurrence of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected patients. AIDS 1996; 10:1521-1527.
82. Frenkel JK, Arnare M, Larsen W. Immune competence in patient with Hodgkin disease and reapsing toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 6: 84-91.
83. Farkash AE, Cabee PJ, Sher JH. Toxoplasmosis in acquired immune deficiency syndrome: a clinical pathological radiological review of 12 cases. J. Neurol. Neurosurg. Psychol. 1986; 49: 744-748.
84. Wreghitt TG, Hakim M, Gray JJ, et al. Toxoplasmosis in heart and lung transplant recipients. J. Clin. Pathol. 1989;42:194-199.

85. Luft BJ. *Toxoplasma gondii*, in "Parasitic Infections in the compromised host". Marcel Dekker, New York. 1989;193-240.
86. Renoult E, Georges E, Biava MF, Hulin C, Frimat L, Hestin D, Kessler M. Toxoplasmosis and kidney transplant recipients: report of six cases and review. Clin. Infect. Dis. 1997; 24:625-634.
87. LUFT B H. Toxoplasmic encephalitis. J. Infect. Dis. 1988;157: 1-6.
88. Wanke, CH. Toxoplasma encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome: diagnosis and response to therapy. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1987;36: 509-516.
89. Remington JS, McLeod R, Desmonts G. Toxoplasmosis,. In: JS Remington and JO Klein. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 4th ed.1995:140-266.
90. Lebech M, Joynson DHM, Seitz HM, Thulliez P, Gibert RE, Dutton GN, Ovlisen B, Petersen E. Classification system and case definitions of *Toxoplasma gondii* infection in immunocompetent pregnant women and their congenitally infected offspring. J. Infect. Dis. 1993;167:691-697.
91. Robert-Gangneux F. Contribution of new techniques for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Clin. Lab. 2001; 47: 135-141.
92. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C and Gilbert R. Mother -to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. Lancet .1999;353:1829-33.
93. Montoya J, Remington JS. Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. Clin. Infect. Dis. 1995; 20:781-789.

94. Remington JB, Efrome E, Cavanaugh HJ. Studies of toxoplasmosis in El Salvador. Prevalence and incidence of toxoplasmosis as measured by the Sabin-Feldman Dye Test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1970;64: 252-267.
95. Mcleod R., Mack D., & Brown C. *Toxoplasma gondii* new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* 1991;72:109-121.
96. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. Control Calidad SEIMC.
97. Diagnóstico serológico de la embarazada. Procedimientos SEIMC.
98. Galván-Ramírez ML, Guillen-Vargas C, Saavedra-Durán R, Islas-Rodríguez A. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31:271-277.
99. Gibson CL, Coleman N. The prevalence of *Toxoplasma* antibodies in Guatemala and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1958;7: 334-338.
100. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:1972-1977
101. Derouin F and Garin YJ. *Toxoplasma gondii*: Blood and tissue kinetics during acute and chronic infections in mice. *Exp. Parasitol.* 1991;73:460-468.
102. Sumyuen MH, Garin YJF and Derouin F. Early Kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. *J. Parasitol.* 1995;81:327-329.

103. Jensen L, Heegaard PM, Lind P. A study of virulence parameters for *Toxoplasma gondii* infections in mice. Parasitol. Res. 1998;84:382-387.
104. Dubey JP. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. J. Parasitol. 1996;82:951-956.
105. Johnson LL. Resistance to *Toxoplasma gondii* in mice infected as neonates or exposed in utero. Infec. and Immunity. 1994:3075-3079.
106. Suzuki Y, Yang Q and Remington JS. Genetic resistance against acute Toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 1995;81:1032-1034.
107. Derouin F, Mazeron MC and Garin YJ. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 1987:1597-1600.
108. Hitt JA, Filice GA. Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture and mouse inoculation. J. Clin. Microbiol. 1992:3181-3184.
109. Hafid J, Flori P, Raberin H and Sung M. Comparison of PCR, capture ELISA and immunoblotting for detection of *Toxoplasma gondii* in infected mice. J. Med. Microbiol. 2001;50:1100-1104.
110. Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, Leng B, Lacut JM. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-Seropositive patients. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:2421-2426.

111. Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Racinet C, Grefenstette I, Bost-Bru C, Goullier-Fleuret and Ambroise-Thomas P. Detection of *Toxoplasma gondii* in 94 placentas from infected women by Polymerase Chain Reaction, *in vivo* and *in vitro* cultures. *Placenta*. 1998;19:545-549.
112. Jhonson AM, Dubey JP & Dame JB. Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. *Aust. J. Esxo. Biol. Med Sci* 1986,64:351-355.
113. Molecular cloning. A laboratory Manual. Sambrook J, Russell D. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y. 2001.
114. PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. Henry A. Erlich editor. 1989. pp 246.
115. Pujol-Riqué M, Derouin F, Garcia-Quintanilla A, Valls ME, Miroi JM, Jimenez De Anta M J. Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and comparison of three DNA purification methods. *J. Med. Microbiol.* 1999;48 :857-862.
116. Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Berandika J, García Pérez AL. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Vet. Parasitol.* 2001;102:17-27.
117. Homan WL, Vercamiren M, De Brakeleer J, Verschueren H. Identification of a 200 to 300 fold repetitive 529 pb DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. J. Parasitol.* 2000;30: 69-75.
118. Contini C, Seraceni S and Cultrera R. Different PCR systems to detect *Toxoplasma gondii* tachyzoites or bradyzoites in clinical specimens from patients with and without overt disease. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1999;46:77-78.

119. Contini C, Seraceni S, Misurati E, Grilli A, Romani R and Cultrera R. A multiplex PCR assay for molecular recognition of *T. gondii* stage-specific genes. *J. Eukariot. Microbiol.* 2001;191-192.
120. Burg JL, Grove CM, Pouletty P, Boothroyd J C. Direct and Sensitive Detection of Pathogenic Protozoan *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1989;27: 1787-1792.
121. Van de Ven, E, Melchers W, Galama J, Camps W, Meuwissen J. Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:2120-2124.
122. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantonius N, Mentis A, Michalas S. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat. Diagn.* 2002; 22: 1107-1111.
123. Foulon W, Pinon JM, Stray-Petersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum PA, Hayde M, Naessens A. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: A multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999;181:843-847.
124. Pelloux H, Weiss J, Simon J, Muet F, Fricker-Hidalgo H, Gouller-Fleuret A, Ambroise-Thomas P. A new set of primers for the detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid using Polymerase Chain Reaction. *FEMS Microbiol. Letters* 1996; 138:11-15.
125. Guy EC and Joynson DH. Potential of the Polymerase Chain Reaction in the diagnosis of active *Toxoplasma* infection by detection of parasite in blood. *J. Infect. Dis.* 1995;172:319-22.

126. Robert-Gangneux F, Gavinet MF, Ancelle T, Raymond J, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: Retrospective study of 110 cases. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:2893-2898.
127. Cazenave J, Forestier F, Bessieres MH, Broussin B, Begueret J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat. Diag.* 1992; 1112:119-127.
128. Martins TB, Hillyard DR, Litwin CM, Taggart EW, Jaskowski TD, Hill HR. Evaluation of a PCR probe capture assay for the detection of *Toxoplasma gondii*. Incorporation of uracil N-glycosylase contamination control. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000;113:714-721
129. Cultrera R, Seraceni S and Contini C. Efficacy of a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting *Toxoplasma gondii* bradyzoite gene expression in human clinical specimens. *Molecular and Cellular Probes.* 2002;16:31-39.
130. A Weiss L M, Udem S A, Salgo M, Tanowitz H B, Wittner M. Sensitive and Specific Detection of *Toxoplasma* DNA in an Experimental Murine Model: Use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the Polymerase Chain Reaction. *J. Infec. Dis.* 1991;163:180-186.
131. Ficker-Hidalgo H, Pelloux H, Muet F, Racinet C, Bvost M, Goullier-Fleuret A, Ambroise-Thomas P. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparative value of fetal blood and amniotic fluid using serological techniques and cultures. *Prenat. Diagn.* 1997; 17:831-835.
132. Hezard N, Marn-Chemia C, Foudrinier F, Villena L, Quereux C, Leroux B, Dupoy D, Falmud M, Pinon M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in 261 pregnancies. *Prenat. Diagn.* 1997; 17:1047-1054.

133. Hohlfeld P, Fernad Daffos, Jean-Marc Costa, Philippe Thulliez, Françoise Forestier and Michel Vidaud. Prenatal Diagnosis of congénital Toxoplasmosis with a Polimerase-Chain- Reaction Test on Amniotic Fluid. N. E. J.Med. 1994.331: 695-700.
134. Forestier F, Hohlfeld P, Sole Y. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis by PCR: extended experience. Pren. Diag. 1998;18:405-415.
135. Cazenave J, Besieres MH., Sourrue D, Cheyrou A. & Begueret J. Detection of toxoplasme for amplication of ADN. Rev. Fr. Lab. 1990,209:118-126.
136. Tóth T, Sziller I and Papp Z. PCR detection of *Toxoplasma gondii* in human fetal tisúes. Methods in Molecular Biology. 2000;92:195-202.
137. Joseph P, Calderón MM, Gliman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, Chavez V, Jiménez JA, CNAG MC, Lopez MJ, Evans CA. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmosis encephalitis in patients with AIDS. J. Clin. Microbiol. 2002:4499-4503.
138. Antinori A, Ammassari A, de Luca A, Cingolani A, Murri R, Scoppettuolo G, Fortini M, Tartaglione T, Larocca LM, Zannoni G, Cattani P, Grillo R, Roselli R, Giacoangeli M, Serrati M, Ortona L. Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: a decision-making analysis based on clinical and neuroradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. Neurology 1997; 48:687-694.
139. Dupouy- Camet J, Lavareda de Souza S, Maslo C, Paugam A, Saimot A G, Benarous R, Tourte-Schaefer C, Derouin F. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous Blood from AIDS patients by Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 1993;31:1866-1869.

140. Renoult E, Georges E, Biava MF, Hulin C, Frimat L, Hestin D, Kessler M. Toxoplasmosis and kidney transplant recipients: report of six cases and review. *Clin. Infect. Dis.* 1997; 24:625-634.
141. Nagel SD & Boothroyd JC. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolip. *J. Biol. Chem.* 1989;264:5569-5574.
142. Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL & Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene coding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1988;141:3584.
143. Costa JM, Dardé ML, Assouline B, Vidau M, Bretagne S. Microsatellite in Beta-Tubulin Gene of *Toxoplasma gondii* as a New Genetic Marker for Use in Direct Screening of Amniotic Fluids. *J. Clin. Microbiol.* 1997;2542-2545.
144. Guay JM, Dubois D, Morency MJ, Gagnon S, Merrcier J, Levesque RC. Detection of the Pathogenic Parasite *Toxoplasma gondii* by specific Amplification of ribosomal sequences using comultiplex Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993;131:203-207.
145. Cazenave J, Forestier F, Bessieres MH, Broussin B, Begueret J. Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat. Diag.* 1992; 112:119-127.
146. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. En Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Editorial. SAGARPA. México 2000. 54pp.
147. Wastling JM and Mattsson JG. Detection of *Toxoplasma gondii*. *Methods in Molecular Biology.* 2000;216:289-97.

148. Miller S, Dykes D. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
149. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor laboratory. Press. 1989. Tomo III.
150. Galván-Ramírez ML, Guillen-Vargas C, Saavedra-Durán R, Islas-Rodríguez A. Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens with sera from toxoplasmosis patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31:271-277.
151. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:246-251.
152. Park BK, Moon HR, Yu JR, Kook J, Chai JY and Lee SH. Comparative susceptibility of different cell lines for culture of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Korean J. Parasitol.* 1993;31:215-22.
153. Lee YH, Yim KY, Kang NS, Chin YW. Detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies in mice with different strains of *Toxoplasma gondii*. *Korean J. Parasitol.* 1995; 33:201-210.

APÉNDICE

1. *Solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6*

Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3).

Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada.

Ajustar el pH a 9.6.

Aforar a 1000 mL.

Mantener a 4^o C.

2. *Solución salina de fosfatos (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01M, pH 7.2 [PBS])*

Medir 800 mL de agua destilada.

Agregar 100 mL de *PB 10X y 8.75 g de NaCl.

Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2.

Aforar a 1000 mL con agua destilada.

Guardar a 4^o C.

***PB 10X.** 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio monobásico monohidratado) + 11.5 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico anhidro). Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar hasta disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

3. *Amortiguador de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)*

A un litro de PBS pH 7.2 (sol. 2) añadir 500 μL de Tween 20.

Guardar a 4^o C.

4. *Solución de bloqueo I (leche descremada al 5%)*

Pesar 5 g de leche descremada en polvo.

Disolver en 100 mL de PBS-Tween (sol. 3).

Guardar a -20^o C.

5. Solución de bloqueo II (albúmina sérica bovina al 1% en PBS-tween 20)

Pesar 1 g de Albúmina Sérica Bóvina (BSA).

Aforar a 100 mL de PBS-Tween (sol. 3).

6. Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD).

Añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1 M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M.

Adicionar 4 μ L de H₂O₂ al 30%.

NOTA: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

7. Solución ácido sulfúrico 2 N

Tomar 98.08 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada.

Aforar a 1000 mL.

8. Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medicom polvo)

Disolver el medio en polvo en 500 mL de agua destilada estéril a una temperatura de 15 a 35 °C.

Agregar 3.7 gramos de NaHCO₃.

Ajustar el pH a 7 si es necesario.

Aforar a 1000 mL con agua destilada estéril.

Esterilizar el medio por membrana de filtración.

9. Solución de lisis preparada en el laboratorio (Tris 50mM, EDTA 1 mM, Tween 20 0.5%, Proteinasa K 200 μ g/mL)

Pesar 0.3 g de Tris-base + 0.02 g de EDTA + 0.25 g de tween 20.

Disolver en 50 mL de agua desionizada.

Adicionar 10 mg de Proteinasa K y aforar a 100 mL con agua desionizada.

10. Solución amortiguadora TBE 10X (Tris 0.89 M, Ácido bórico 0.89 M, EDTA 0.02 M)

Pesar 108 g de Tris-Base + 55 g de ácido bórico.

Disolver en 600 mL de agua desionizada.

Adicionar 100 mL de una solución de EDTA 0.2 M, pH=8.0.

Aforar a 1000 mL con agua desionizada.

Guardar a 4°C.

*** TBE 1X**

Medir 800 mL de agua desionizada.

Adicionar 100 mL de la solución TBE 10X.

Aforar a 1000 mL con agua desionizada.

Guardar a 4°C.

11. Solución de Bromuro de Etidio (0.5mg/mL)

Medir 60 mL de agua desionizada.

Pesar 50 mg de Bromuro de etidio.

Aforar a 100 mL de agua desionizada.

12. Solución amortiguadora de carga 10X (Ficoll 400 al 2%, EDTA 0.01 M pH=8, Azul de bromofenol 0.025%, SDS 0.1%)

Medir 60 mL de agua desionizada.

Adicionar 5 mL de una solución de EDTA 0.2 M, pH=8 + 2 g de Ficoll 400 + 0.025 g de azul de bromofenol + 0.1 g de SDS.

Aforar a 100 mL con agua desionizada.

Guardar a 4°C.

13. Solución de Azul de tripano al 0.04%

Medir 60 mL de agua desionizada.

Pesar 40 mg de Azul de tripano.

Aforar a 100 mL de agua desionizada.

Conteo y viabilidad celular

Realizar una dilución 1:10 de la muestra con azul de tripano (Sigma) al 0.04%, tomar 5 μL de la muestra más 45 μL del colorante.

Contar los cuatro cuadrantes de la zona de glóbulos blancos en la cámara de Neubauer.

Determinar el número total de células con la siguiente fórmula:

No. Total de células = Células vivas X 4 X Factor de dilución X 2,500

Determinar el % de viabilidad con la siguiente fórmula:

% Viabilidad = No. de células vivas / No. de células vivas y muertas.

Calcular el % de pureza con la siguiente fórmula:

% Pureza = No. total de taquizoitos / No. total de taquizoitos + células presentes en la muestra.

Cuantificación y pureza del DNA

Realizar una dilución 1:250 del DNA, tomando 2 μL de la muestra (DNA) en 500 μL de H_2O desionizada y homogenizar.

Para cuantificar y comparar la pureza, leer las muestras a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 320 nm y se utilizan las siguientes fórmulas.^{148,149}

$$[\text{DNA}] (\text{ng/mL}) = \text{Dilución} \times 50 \text{ ng/mL} \times A_{260}$$

Donde:

DNA = 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$

Factor de dilución = 250

$$\text{Pureza} = A_{260}/A_{280}$$

Donde:

A 260 nm: DNA (anillos aromáticos)

A 280 nm: Proteínas

A 320 nm: Impurezas del agua

Interpretación:

Mayor a 2.0: contaminación por reactivos

Ideal: 1.7

Menor a 1.7: contaminación por proteínas

Gel de agarosa al 1%

Pesar 1 g de agarosa (InVitrogen) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Adicionar 100 mL de sol. amortiguadora TBE IX y marcar el nivel del volumen en el matraz.

Fundir la agarosa en microondas o baño maría.

Ajustar el volumen faltante con amortiguador TBE IX.

Dejar enfriar un poco.

Adicionar 0.1 mL de la solución de bromuro de etidio 0.5 mg/mL .

Agitar y decantar en la cámara horizontal, colocar el peine.

Dejar gelificar durante 15 minutos, quitar el peine, agregar amortiguador TBE IX hasta cubrir totalmente el gel y cargar la muestra.

Para cargar la muestra se colocan: 4 μ L de DNA + 6 μ L de solución amortiguadora de carga.

Las condiciones de la electroforesis son: voltaje 80-100 V/cm durante 40 minutos y observar el gel en un transiluminador UV (UVP) y tomar una fotografía con la ayuda de una cámara Polaroid.

Infección in vivo

Infectar por vía intraperitoneal a ratones BALB/c de 6 semanas de edad, con las dosis de infección seleccionadas, limpiar la región abdominal, con algodón y alcohol dentro de una campana de flujo laminar. Cada grupo de infección debe permanecer en una caja etiquetada por separado y marcar cada ratón con una clave. Mantener a cada grupo de ratones por dos meses con agua y alimento *ad libidum*, en condiciones de aire libre, en el bioterio del Instituto.

Aislamiento in vivo

Para el procesamiento las muestras almacenadas a -70°C . Centrifugar a 3,000 rpm durante 3 minutos, eliminar el sobrenadante y lavar el botón resultante 3 veces con 1 mL de PBS y centrifugar a 3,000 rpm durante 5 minutos.